

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 317**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2009 PCT/EP2009/005004**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO10006732**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2009 E 09777089 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2304038**

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

30 Prioridad:

**17.07.2008 US 135230 P**  
**18.07.2008 EP 08075648**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.03.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LAGA, BENJAMIN;**  
**DEN BOER, BART y**  
**LAMBERT, BART**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 604 317 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Planta de Brassica que comprende un alelo INDEHISCENT mutante

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 Esta invención se refiere al campo de la agricultura, más específicamente al uso de técnicas de biología molecular para alterar plantas de semillas dehiscentes, particularmente de la familia *Brassicaceae*, y/o acelerar la reproducción de tales plantas de semillas dehiscentes. Más específicamente, la invención se refiere a métodos y medios mejorados para reducir el desgranado de la semilla, o retrasar el desgranado de la semilla hasta después de la cosecha, en plantas tales como plantas *Brassicaceae*, particularmente plantas *Brassicaceae* que se hacen crecer para la producción de semillas, a la vez que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. También se describen métodos para identificar marcadores moleculares asociados con el desgranado reducido o retrasado de semillas en una población de plantas de semillas dehiscentes. También se describen métodos y medios para incrementar la productividad, particularmente la productividad de granos y semillas. El fenotipo de incremento de la productividad se puede separar del fenotipo de desgranado reducido o retrasado de semillas.

## 15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

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

35 Las variedades comerciales actuales de colza son extremadamente susceptibles al desgranado. Hay poca variación para la resistencia al desgranado dentro de los programas de cultivo de *B. napus* existentes, pero se han encontrado líneas resistentes dentro de los progenitores diploides de *B. napus* (*B. oleracea* y *B. rapa*) así como dentro de otros miembros del género de *Brassica*, principalmente *B. juncea*, *B. carinata* y *B. nigra*. Kadkol et al. (1986, Aust. J. Botany 34 (5): 595-601) dan a conocer una mayor resistencia frente al desgranado en ciertos registros de *B. campestris* que estaba asociada con la ausencia de una capa de separación en la región de unión de valvas de silicua al replum. Prakash y Chopra (1988, Plant breeding 101: 167-168) describen la introgresión de la resistencia al desgranado en *Brassica napus* desde *Brassica juncea* mediante recombinación no homóloga. Spence et al. (1996, J of Microscopy 181: 195-203) describen que algunas líneas de *Brassica juncea* muestran una tendencia reducida a desgranarse en comparación con líneas de *Brassica napus*. Morgan et al., 1998 (Fields Crop Research 58, 153-165) describen variación genética para la resistencia al desgranado de vainas entre líneas de colza desarrolladas a partir de *B. napus* sintético, y concluyen que las líneas que requirieron mucha energía para abrir sus vainas parecieron tener una mayor vascularización en la zona de dehiscencia y una degradación reducida de la pared celular en la zona de dehiscencia. Encontraron además una correlación negativa significativa entre la longitud del pico de las vainas y la fuerza necesaria para provocar el desgranado de las vainas. Child y Huttly (1999, Proc 10th Int. Rapeseed Congress) describen la variación en la maduración de vainas en *B. napus* mutante inducida por irradiación y una población de sus variedades de cultivo progenitoras, Jet Neuf, en la que las plantas de tipo salvaje y mutantes más resistentes mostraron una gran lignificación de grupos de células a lo largo de la zona de dehiscencia, y en la que se describieron trazas vasculares situadas próximas al borde interno de la zona de dehiscencia en el mutante, para ayudar a asegurar las valvas. Child et al. (2003, J Exp Botany 54 (389): 1919-1930) describen además la asociación entre una mayor resistencia al desgranado de las vainas y cambios en la estructura vascular en vainas de una línea de *Brassica napus* resintetizada. Sin embargo, los métodos tradicionales para el cultivo no han tenido éxito a la hora de introducir resistencia al desgranado en variedades de cultivo de colza, sin interferir con otros rasgos deseables tales como floración temprana, maduración y resistencia al pie negro (Prakash y Chopra, 1990, Genetical Research 56: 1-2).

Se han identificados varios genes, que promueven o inhiben la dehiscencia de las vainas, en *Arabidopsis thaliana* a través del análisis de mutantes: mutantes combinados tanto en *SHATTERPROOF1* (*SHP1*; inicialmente denominado como *AGL1*) como en *SHATTERPROOF2* (*SHP2*; inicialmente denominado como *AGL5*) dan como resultado

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

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

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

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

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

Vancanneyt et al., 2002 (XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, España 28 de junio-2 de julio; 2002) también dieron a conocer que el silenciamiento del gen *IND* en *Arabidopsis thaliana* usando las denominadas técnicas de silenciamiento de ARNbc dio como resultado una resistencia casi completa al desgranado de las vainas. El noventa y ocho por ciento de las líneas transgénicas de *Arabidopsis* desarrolló silicuas, que no se abrieron a lo largo de la sutura de la valva, y solo se pudieron abrir aplicando una presión considerable a las valvas.

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

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

El documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052) describe plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en particular plantas de *Brassica napus*, caracterizadas por que comprenden tres alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos en su genoma, y en las que la resistencia de las plantas al desgranado de las vainas está significativamente incrementada en comparación con la resistencia al desgranado de las vainas de una planta que no comprende alelos *IND* mutantes, pero en la que la planta mantiene preferiblemente una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas.

Tabla con el codón STOP y mutaciones de sustitución en *IND-A1* and *IND-C1* como se describen en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052):

Posición del aminoácido	Posición del nucleótido		Codón de tipo salvaje → mutante	Aminoácido de tipo salvaje → mutante	Planta M2 n°	Alelo n°
	SEC ID: 1	SEC ID: 5				
SEC ID: 2/6	SEC ID: 1	SEC ID: 5				
122	364	924	cag → tag	GLN → STOP (en b)	POSH101,	<i>ind-al-EMS01</i> ,
103	307	867	gat → aat	ASP → ASN	POSH105	<i>ind-al-EMS05</i>
127	380	940	cgt → cat	ARG → HIS (en b)	POSH105	<i>ind-al-EMS05</i>
SEC ID: 4/8	SEC ID: 3	SEC ID: 7				
50	148	644	caa → taa	GLN → STOP	POSH106	<i>ind-cl-EMS01</i>
135	403	899	cag → tag	GLN → STOP (en b)	POSH108	<i>ind-cl-EMS03</i>

Las invenciones descritas aquí en lo sucesivo en las diferentes realizaciones, ejemplos y reivindicaciones proporcionan métodos y medios mejorados adicionales para modular las propiedades de dehiscencia en plantas de semillas dehiscentes. Más específicamente, la presente invención describe métodos y medios mejorados adicionales para reducir el desgranado de las semillas, o retrasar el desgranado de las semillas hasta después de la cosecha, en plantas tales como plantas *Brassicaceae*, particularmente plantas *Brassicaceae* que se hacen crecer para la producción de semillas, a la vez que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. En particular, la presente solicitud describe plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en particular plantas de *Brassica napus*, caracterizadas por que comprenden dos alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos en su genoma o dos alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos, y en las que la resistencia al desgranado de las vainas de las plantas está significativamente incrementada en comparación con la resistencia al desgranado de las vainas de una planta que no comprende alelos *IND* mutantes, pero en la que la planta mantiene preferiblemente una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. También se describen métodos y medios para incrementar la productividad, particularmente la productividad de granos y semillas. El fenotipo de incremento de la productividad se puede separar del fenotipo de desgranado reducido o retrasado de las semillas.

### SUMARIO DE LA INVENCION

Los inventores encontraron que también se pueden obtener plantas de *Brassica napus* con un fenotipo de desgranado de las vainas similar a las plantas de *Brassica* descritas en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), es decir, que combina una resistencia incrementada al desgranado de las vainas con una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas, combinando dos alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos con o sin dos alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos, en lugar de combinar tres alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos.

De este modo, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una planta de *Brassica napus* que

comprende al menos dos genes *IND*, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, caracterizada por que comprende al menos dos alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos en su genoma, en la que dicho alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido es un alelo *IND* que produce una proteína *IND* en la que al menos un aminoácido seleccionado del aminoácido en una posición que corresponde a la posición 124 de SEC ID NO: 2, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 146 de SEC ID NO: 2, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 159 de SEC ID NO: 2, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 136 de SEC ID NO: 4, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 139 de SEC ID NO: 4, o el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 142 de SEC ID NO: 4, se sustituye por otro aminoácido, de manera que la actividad biológica de la proteína *IND* producida se reduce pero no se anula completamente en comparación con la proteína *IND* funcional de tipo salvaje correspondiente. En una realización, los genes *IND* son genes *IND-A1* o *IND-C1*. En otra realización, los genes *IND* comprenden una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3 desde el nucleótido en la posición 46 al nucleótido en la posición 633, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5, o SEC ID NO: 7; y una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 al aminoácido en la posición 21 o SEC ID NO: 4. En una realización adicional, los alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos son alelos *IND* mutantes del gen *IND-C1*. En todavía una realización adicional, los alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos se seleccionan del grupo que consiste en *ind-a1-EMS06*, *ind-a1-EMS09*, *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS04*, *ind-c1-EMS08* e *ind-c1-EMS09*. En aún una realización adicional, la planta comprende además al menos un alelo *IND* mutante totalmente genosuprimido en su genoma. En todavía una realización adicional, el alelo *IND* mutante totalmente genosuprimido es un alelo *IND* mutante del gen *IND-C1*. En otra realización, el alelo *IND* mutante totalmente genosuprimido se selecciona del grupo que consiste en *ind-a1-EMS01*, *ind-a1-EMS05*, *ind-c1-EMS01* e *ind-c1-EMS03*. En aún otra realización, la planta es homocigótica para el alelo *IND* mutante parcialmente y/o totalmente genosuprimido. La planta según la invención puede producir una cantidad significativamente producida de proteína *IND* funcional en comparación con la cantidad de proteína *IND* funcional producida mediante una planta correspondiente que no comprende alelos *IND* mutantes. En una realización adicional, el desgranado de las semillas de la planta se reduce o retrasa significativamente en comparación con el desgranado de las semillas de una planta correspondiente que no comprende alelos *IND* mutantes. En una realización incluso adicional, la planta mantiene una capacidad de trilla agronómicamente relevante de las vainas.

También se describe una planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, que comprende al menos un alelo mutante parcialmente genosuprimido de un gen *IND* en su genoma, en la que el gen *IND* comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3 desde el nucleótido en la posición 46 al nucleótido en la posición 633, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5, o SEC ID NO: 7; y una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 al aminoácido en la posición 21 o SEC ID NO: 4. El alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido de dicha planta se puede seleccionar del grupo que consiste en *ind-a1-EMS06*, *ind-a1-EMS09*, *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS04*, *ind-c1-EMS08* e *ind-c1-EMS09*. El alelo *IND* mutante puede derivar de una planta de una especie de *Brassica*. La planta puede ser una planta de una especie de *Brassica*.

Se describe además una vaina de semilla obtenible de las plantas de la invención.

También se describe un alelo mutante parcialmente genosuprimido de un gen *IND*, en el que el gen *IND* comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3 desde el nucleótido en la posición 46 al nucleótido en la posición 633, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5, o SEC ID NO: 7; y una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 al aminoácido en la posición 21 o SEC ID NO: 4. El alelo mutante se puede seleccionar del grupo que consiste en *ind-a1-EMS06*, *ind-a1-EMS09*, *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS04*, *ind-c1-EMS08* e *ind-c1-EMS09*. El alelo mutante puede derivar de una planta de una especie de *Brassica*, preferiblemente de una especie de cultivo de *Brassica* o una especie de oleaginosa de *Brassica*. También se describe una proteína *IND* codificada por los alelos *IND* mutantes como se describen aquí.

También se describe un método para identificar un alelo *IND* mutante según la invención en una muestra biológica, que comprende determinar la presencia de una región específica *IND* mutante en un ácido nucleico presente en la muestra biológica. El método puede comprender además someter la muestra biológica a un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa usando un conjunto de al menos dos cebadores, seleccionándose dicho conjunto a partir del grupo que consiste en: un conjunto de cebadores, en el que uno de dichos cebadores reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' del alelo *IND* mutante y el otro de dichos cebadores reconoce específicamente la región de flanqueo de 3' del alelo *IND* mutante, respectivamente; un conjunto de cebadores, en el que uno de dichos cebadores reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y el otro de dichos cebadores reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante; y un conjunto de cebadores, en el que uno de dichos cebadores reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o de 3' del alelo *IND* mutante y el otro de dichos cebadores reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo de 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente. El cebador que reconoce específicamente la región de

5 flaqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia nucleotídica de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de flaqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, respectivamente, o el cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia nucleotídica de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, o el cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flaqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia nucleotídica de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flaqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, en el que dichos 17 a 200 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de las secuencias de mutación o de flaqueo. El cebador que reconoce específicamente la región de flaqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante puede comprender en su extremo 3' una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de flaqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, respectivamente, o el cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante puede comprender en su extremo 3' una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, o el alelo que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flaqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante puede comprender en su extremo 3' una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flaqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, en el que dichos 17 nucleótidos consecutivos situados en 3' no derivan exclusivamente de las secuencias de mutación o de flaqueo. El método puede comprender además someter la muestra biológica a un ensayo de hibridación usando un conjunto de sondas específicas que comprenden al menos una sonda específica, seleccionándose dicho conjunto del grupo que consiste en: un conjunto de sondas específicas, en el que una de dichas sondas reconoce específicamente la región de flaqueo de 5' del alelo *IND* mutante, y la otra de dichas sondas reconoce específicamente la región de flaqueo de 3' del alelo *IND* mutante; un conjunto de sondas específicas, en el que una de dichas sondas reconoce específicamente la región de flaqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante, y la otra de dichas sondas reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante; un conjunto de sondas específicas, en el que una de dichas sondas reconoce específicamente la región de flaqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante, y la otra de dichas sondas reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante; un conjunto de sondas específicas, en el que una de dichas sondas reconoce específicamente la región de unión entre la región de flaqueo de 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente; y una sonda específica que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flaqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante. La sonda que reconoce específicamente la región de flaqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia nucleotídica de 13 a 1000 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región de flaqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, respectivamente, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con ella, o la sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia nucleotídica de 13 a 1000 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con ella, o la sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flaqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia nucleotídica de 13 a 1000 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flaqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, respectivamente, en el que dichos 13 a 1000 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de las secuencias de mutación o de flaqueo, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con ella. La sonda que reconoce específicamente la región de flaqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante puede comprender una secuencia nucleotídica de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región de flaqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, respectivamente, o la sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante puede comprender una secuencia nucleotídica de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, o la sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flaqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante puede comprender una secuencia nucleotídica de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flaqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento de la misma, respectivamente, en el que dichos al menos 13 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de las regiones de mutación o de flaqueo. La región de flaqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 929 o 931 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 930 de SEC ID NO: 5 o del complemento de la misma; y dicha región de unión puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 930 o 930 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; o la región de flaqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 995 o 997 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 996 de SEC ID NO: 5 o del complemento de la misma; y dicha región de unión puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 996 o 996 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; o la región de flaqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 1035 o 1037 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 1036 de SEC ID NO: 5 o del complemento de la misma; y dicha región de unión puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 1036 o 1036 a 1622 o del

complemento de la misma, respectivamente; o la región de flanqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 902 o 904 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 903 de SEC ID NO: 7 o del complemento de la misma; y dicha región de unión puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 903 o 903 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; o la región de flanqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 910 o 912 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 911 de SEC ID NO: 7 o del complemento de la misma; y dicha región de unión puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 911 o 911 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; o la región de flanqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 919 o 921 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 920 de SEC ID NO: 7 o del complemento de la misma; y dicha región de unión puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 920 o 920 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente. El conjunto de sondas se puede seleccionar del grupo que consiste en: un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 11 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 12; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 14 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 15; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 17 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 18; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 20 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 21; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 23 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 24; y un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 26 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 27.

Se describe un método para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante según 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 región específica *IND* de tipo salvaje correspondiente en el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma. El método puede comprender además someter el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, a un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa usando un conjunto de al menos dos o al menos tres cebadores, en el que al menos dos de dichos cebadores reconocen específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje, seleccionándose dichos al menos dos cebadores del grupo que consiste en: un primer cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo de 3' o 5' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, respectivamente; un primer cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje; y un primer cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo de 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje, respectivamente; y en el que al menos dos de dichos cebadores reconocen específicamente el alelo *IND* mutante, seleccionándose dichos al menos dos cebadores del grupo que consiste en: el primer cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y el segundo cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo de 3' o 5' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, respectivamente; el primer cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y un tercer cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante; y el primer cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y un tercer cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo de 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente. El cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje puede consistir en una secuencia nucleotídica de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje o del complemento de la misma, respectivamente; o los cebadores que reconocen específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje pueden consistir en una secuencia nucleotídica de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flanqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje o del complemento de la misma, respectivamente, en los que dichos 17 a 200 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de la región de mutación o de las secuencias de flanqueo. El cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje puede comprender en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje o del complemento de la misma, respectivamente; o los cebadores que reconocen específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje pueden comprender en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje o del complemento de la misma, respectivamente; o los cebadores que reconocen específicamente la

región de unión entre la región de flanqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje pueden comprender en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flanqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje o del complemento de la misma, respectivamente, en el que dichos 17 nucleótidos consecutivos situados en 3' no derivan exclusivamente del sitio o región de mutación o de las secuencias de flanqueo. El método puede comprender además someter el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, a un ensayo de hibridación que usa un conjunto de al menos dos sondas específicas, en el que al menos al menos una de dichas sondas específicas reconoce específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje, seleccionándose dicha al menos una sonda del grupo que consiste en: una primera sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y una segunda sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo de 3' y 5' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, respectivamente; una primera sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y una segunda sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje; una primera sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y una segunda sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo de 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje, respectivamente; y una sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje; y en el que al menos una de dichas sondas específicas reconoce o reconocen específicamente el alelo *IND* mutante, seleccionándose dicha al menos una sonda del grupo que consiste en: la primera sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y la segunda sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo de 3' o 5' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, respectivamente; la primera sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y una tercera sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante; la primera sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje, y una tercera sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante; y una sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante. La sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje puede consistir en una secuencia nucleotídica de 13 a 1000 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje o del complemento de la misma, respectivamente, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con ella, o la sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje puede consistir en una secuencia nucleotídica de 13 a 1000 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje, respectivamente, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con ella, o la sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje puede consistir en una secuencia nucleotídica de 13 a 1000 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flanqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje, respectivamente, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con ella, en la que dichos 13 a 1000 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente del sitio o región de mutación o de las secuencias de flanqueo. La sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante y del de tipo salvaje puede comprender una secuencia nucleotídica de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de flanqueo de 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje o del complemento de la misma, respectivamente, o la sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje puede comprender una secuencia nucleotídica de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje o del complemento de la misma, o la sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje puede comprender una secuencia nucleotídica de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flanqueo de 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del de tipo salvaje o del complemento de la misma, respectivamente, en la que dichos al menos 13 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de la mutación o de las secuencias de flanqueo. La región de flanqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 929 o 931 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 930 de SEC ID NO: 5 o del complemento de la misma; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia a o el complemento de la misma; dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 930 o 930 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 929 seguida de a o a seguida de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 931 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; o la región de flanqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 995 o 997 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 996 de SEC ID NO: 5 o del complemento de la misma; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia a o el complemento de la misma; dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 996 o 996 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia nucleotídica de



SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 995 seguida de a o a seguida de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 997 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; o la región de flanqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 1035 o 1037 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 1036 de SEC ID NO: 5 o del complemento de la misma; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia t o el complemento de la misma; dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 1036 o 1036 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 1035 seguida de t o t seguida de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1037 a 1622 o del complemento de la misma, respectivamente; o la región de flanqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 902 o 904 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 903 de SEC ID NO: 7 o del complemento de la misma; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia t o el complemento de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 903 o 903 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 902 seguida de t o t seguida de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 904 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; o la región de flanqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 910 o 912 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 911 de SEC ID NO: 7 o del complemento de la misma; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia a o el complemento de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 911 o 911 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 910 seguida de a o a seguida de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 912 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; o la región de flanqueo de 5' o 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 919 o 921 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia nucleotídica de nucleótido 920 de SEC ID NO: 7 o del complemento de la misma; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia t o el complemento de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 920 o 920 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 a 919 seguida de t o t seguida de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 921 a 1593 o del complemento de la misma, respectivamente. El conjunto de al menos tres sondas específicas se puede seleccionar del grupo que consiste en: un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 11, una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 12, y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 13; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 14, una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 15, y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 16; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 17, una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 18, y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 19; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 20, una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 21 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 22; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 23, una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 24 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 25; y un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 26, una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 27 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 28.

50 También se describen kits para identificar un alelo *IND* mutante según la invención en una muestra biológica, y kits para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante según la invención en una planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, que comprenden los cebadores o sondas como se describen anteriormente, como también se describen métodos para combinar los alelos *IND* mutantes según la invención en una planta, métodos para transferir los alelos *IND* mutantes según la invención desde una planta a otra planta, y métodos para obtener una planta o semilla (híbrida) según la invención.

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

#### DEFINICIONES GENERALES

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

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

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

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

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

Como se usa aquí, “una capacidad de trilla agrónomicamente relevante” se refiere a la resistencia de una vaina, particularmente una vaina de colza, a abrirse a lo largo de la zona de dehiscencia de la vaina con liberación concurrente de las semillas, al aplicar fuerzas físicas que permiten la apertura completa de las vainas mientras previene el daño a las semillas, como se usan por ejemplo en una cosechadora combinada. Se ha descubierto una correlación positiva entre la semivida de la muestra de vainas (“LD50”) en un ensayo de impactos aleatorios y su capacidad de trilla. Las semividas de muestras de vainas de colza, según se determinan en un RIT realizado como se describe en los Ejemplos, que corresponden a la capacidad de trilla agrónomicamente relevante, no deberían superar 80 segundos. Los valores de semivida de las muestras típicos para líneas de control de variedades de colza comercialmente disponibles son de alrededor de 10 segundos. De este modo, las líneas con resistencia al desgranado de las vainas significativamente incrementada con capacidad de trilla agrónomicamente relevante tienen una semivida de la muestra de vainas en RIT entre alrededor de 10 y alrededor de 80 segundos, entre alrededor de 10 y alrededor de 70 segundos, entre alrededor de 15 y alrededor de 70 segundos, entre alrededor de 10 y alrededor de 60 segundos, entre alrededor de 10 y alrededor de 50 segundos, entre alrededor de 20 y alrededor de 60 segundos, entre alrededor de 20 y alrededor de 50 segundos, entre alrededor de 40 y alrededor de 60 segundos, de alrededor de 57 segundos.

“Planta de semilla dehiscente” significa una planta que produce un fruto dehiscente seco, que tiene paredes del fruto que se abren para permitir que escapen las semillas contenidas en él. Los frutos dehiscentes contienen habitualmente varias semillas, e incluyen los frutos conocidos, por ejemplo, como legumbres, cápsulas y silicuas.

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

La expresión “secuencia de ácido nucleico” (o molécula de ácido nucleico) se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma mono o bicatenaria, particularmente un ADN que codifica una proteína o fragmento proteico como se describe aquí. Una “secuencia de ácido nucleico endógena” se refiere a una secuencia de ácido nucleico en una célula vegetal, por ejemplo, un alelo endógeno de un gen *IND* presente en el genoma nuclear de una célula de *Brassica*. Una “secuencia de ácido nucleico aislada” se usa para referirse a una secuencia de ácido nucleico que ya no está en su entorno natural, por ejemplo, *in vitro* o en una célula hospedante bacteriana o vegetal recombinante.

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

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

Los términos “proteína” se refiere a una molécula que consiste en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo de acción específico, tamaño, estructura tridimensional u origen. Un “fragmento” o “porción” de una proteína IND puede así todavía referirse como una “proteína”. Una “proteína aislada” se usa para referirse a una proteína que ya no está en su entorno natural, por ejemplo, *in vitro* o en una célula hospedante bacteriana o vegetal recombinante. “Aminoácidos” son los bloques de construcción principales de las proteínas y enzimas. Se incorporan en proteínas mediante ARN de transferencia según el código genético mientras el ARN mensajero es decodificado por los ribosomas. Durante y después del ensamblaje final de una proteína, el contenido de aminoácidos dicta las propiedades espaciales y bioquímicas de la proteína o enzima. La cadena principal de aminoácidos determina la secuencia primaria de una proteína, pero la naturaleza de las cadenas laterales determina las propiedades de la

proteína. “Aminoácidos similares”, como se usa aquí, se refiere a aminoácidos que tienen cadenas laterales de aminoácidos similares, es decir, aminoácidos que tienen cadenas laterales polares, no polares o prácticamente neutras. “Aminoácidos no similares”, como se usa aquí, se refiere a aminoácidos que tienen cadenas laterales de aminoácidos diferentes, por ejemplo un aminoácido con una cadena lateral polar es no similar a un aminoácido con una cadena lateral no polar. Las cadenas laterales polares tienden habitualmente a estar presentes en la superficie de una proteína en la que pueden interactuar con el entorno acuoso encontrado en las células (aminoácidos “hidrófilos”). Por otro lado, los aminoácidos “no polares” tienden a residir en el centro de la proteína, donde pueden interactuar con vecinos no polares similares (“aminoácidos hidrófobos”). Los ejemplos de aminoácidos que tienen cadenas laterales polares son arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina, y treonina (todos hidrófilos, excepto cisteína, que es hidrófoba). Los ejemplos de aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares son alanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, y triptófano (todos hidrófobos, excepto glicina, que es neutra).

La expresión “factor de transcripción” se usa para referirse a una proteína que consiste en al menos dos dominios discretos – un dominio de unión a ADN y un dominio de activación o represión – que operan juntos para modular la velocidad de inicio transcripcional a partir de promotores génicos diana (Ptashne, 1988, Nature 335, 683-689). La expresión “factor de transcripción con dominio de hélice-bucle-hélice básica (bHLH)” se usa para referirse a un factor de transcripción que comprende, aparte del dominio de unión a ADN bHLH (Heim et al., 2003, Mol Biol Evol 20, 735-747; Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15, 1749-1770), dominios que se sabe que son importantes para la regulación de la expresión génica que pueden conservarse a nivel de aminoácidos en proteínas relacionadas procedentes de diferentes especies (Quong et al., 1993, Mol Cell Biol 13, 792-800). Los reguladores transcripcionales que comprenden un dominio bHLH se unen a ADN a través de restos en la región básica mientras que el dominio de hélice-bucle-hélice promueve la dimerización, permitiendo que los miembros de la familia formen hetero- u homodímeros (Murre et al., 1989, Cell 56, 777-783).

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

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

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

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

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

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

Un “ensayo molecular” (o ensayo) se refiere aquí a un ensayo que indica (directa o indirectamente) la presencia o ausencia de uno o más alelos *IND* particulares en uno o ambos loci *IND* (por ejemplo, en uno o ambos de los loci

IND-A1 o IND-C1). Puede permitir determinar si un alelo IND particular (tipo salvaje o mutante) es homocigótico o heterocigótico en el locus en cualquier planta individual.

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

Como se usa aquí, la expresión “IND de tipo salvaje” (por ejemplo, *IND-A1* o *IND-C1* de tipo salvaje) significa un alelo *IND* de origen natural encontrado en plantas, en particular plantas *Brassicaceae*, especialmente plantas de *Brassica*, que codifica una proteína IND funcional (por ejemplo, una *IND-A1* o *IND-C1* funcional, respectivamente). Por el contrario, el término “IND mutante” (por ejemplo *IND-A1* o *IND-C1* mutante), como se usa aquí, se refiere a un alelo *IND* que no codifica una proteína IND funcional, es decir, un alelo *IND* que codifica una proteína IND no funcional (por ejemplo, una *IND-A1* o *IND-C1* no funcional, respectivamente), que, como se usa aquí, se refiere a una proteína IND que no tiene actividad biológica o que tiene una actividad biológica significativamente reducida en comparación con la proteína IND funcional de tipo salvaje correspondiente, o que no codifica ninguna proteína IND en absoluto. Un alelo *IND* mutante “totalmente genosuprimido” o “nulo”, como se usa aquí, se refiere a un alelo *IND* mutante que codifica una proteína IND que no tiene actividad biológica en comparación con la proteína IND funcional de tipo salvaje correspondiente, o que no codifica ninguna proteína en absoluto. Tal “alelo *IND* mutante totalmente genosuprimido” es, por ejemplo, un alelo *IND* de tipo salvaje que comprende una o más mutaciones en su secuencia de ácido nucleico, por ejemplo una o más mutaciones sin sentido o de sentido erróneo. En particular, tal alelo *IND* mutante totalmente genosuprimido es un alelo *IND* de tipo salvaje que comprende una mutación que da preferiblemente como resultado la producción de una proteína IND que carece de al menos un dominio funcional, tal como el dominio de activación, el dominio de unión a ADN y/o el dominio de dimerización, o que carece de al menos un aminoácido crítico para su función, tal como un aminoácido crítico para la unión al ADN, por ejemplo la arginina en la posición 127 en SEC ID NO: 2 o en la posición 140 en SEC ID NO: 4 y similar, o la glutamina en la posición 122 en SEC ID NO: 2 o en la posición 135 en SEC ID NO: 4 y similar, de manera que la actividad biológica de la proteína IND está completamente abolida, o por lo cual la mutación o mutaciones no dan preferiblemente como resultado la producción de una proteína IND. Un alelo *IND* mutante “parcialmente genosuprimido”, como se usa aquí, se refiere a un alelo *IND* mutante que codifica una proteína IND que tiene una actividad biológica significativamente reducida en comparación con la proteína IND funcional de tipo salvaje correspondiente. Tal “alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido” es, por ejemplo, un alelo *IND* de tipo salvaje que comprende una o más mutaciones en su secuencia de ácido nucleico, por ejemplo una o más mutaciones de sentido erróneo. En particular, tal alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido es un alelo *IND* de tipo salvaje que comprende una mutación que da preferiblemente como resultado la producción de una proteína IND en la que al menos un aminoácido conservado y/o funcional se sustituye por otro aminoácido, de manera que la actividad biológica está significativamente reducida pero no completamente anulada. Tal alelo *IND* mutante total o parcialmente genosuprimido también puede codificar una proteína IND negativa dominante, que es capaz de afectar de forma adversa a la actividad biológica de otras proteínas IND en la misma célula. Tal proteína IND negativa dominante puede ser una proteína IND que todavía es capaz de interactuar con los mismos elementos que la proteína IND de tipo salvaje, pero que bloquea algún aspecto de su función. Los ejemplos de proteínas IND negativas dominantes son proteínas IND que carecen del dominio de activación y/o del dominio de dimerización o de restos de aminoácidos específicos críticos para la activación y/o dimerización, pero todavía contienen el dominio de unión a ADN, de manera que no solo se reduce o anula su propia actividad biológica, sino que reducen además la actividad IND total en la célula al competir con proteínas IND de tipo salvaje y/o parcialmente genosuprimidas presentes en la célula por los sitios de unión al ADN. Otros ejemplos de proteínas IND negativas dominantes son proteínas IND que carecen del dominio de activación y/o del dominio de unión a ADN o de restos de aminoácidos específicos críticos para la activación y/o para la unión a ADN pero todavía contienen el dominio de dimerización, de manera que no solo se reduce o anula su propia actividad biológica, sino que además reducen la actividad IND total en la célula al producir dímeros proteicos que carecen de al menos un dominio funcional. Los alelos mutantes de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína IND se designan aquí como “*ind*” (por ejemplo *ind-a1* o *ind-c1*, respectivamente). Los alelos mutantes pueden ser alelos “mutantes naturales”, que son alelos mutantes encontrados en la naturaleza (por ejemplo, producidos espontáneamente sin la aplicación humana de mutágenos), o alelos “mutantes inducidos”, que son inducidos por intervención humana, por ejemplo, mediante mutagénesis.

Una “cantidad significativamente reducida de proteína IND funcional” (por ejemplo proteína *IND-A1* o *IND-C1* funcional) se refiere a una reducción en la cantidad de una proteína IND funcional producida por la célula que comprende un alelo *IND* mutante en al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% (es decir, no se produce proteína IND funcional por la célula) en comparación con la cantidad de la proteína IND funcional producida por la célula que no comprende el alelo *IND* mutante. Esta definición engloba la producción de una proteína IND “no funcional” (por ejemplo, proteína IND truncada) que no tiene actividad biológica *in vivo*, la reducción en la cantidad absoluta de la proteína IND funcional (por ejemplo, no obteniéndose proteína IND funcional debido a la mutación en el gen *IND*), la producción de una proteína IND con actividad biológica significativamente reducida en comparación

con la actividad de una proteína IND de tipo salvaje funcional (tal como una proteína IND en la que uno o más restos de aminoácidos que son cruciales para la actividad biológica de la proteína IND codificada, como se ejemplifica más abajo, se sustituyen por otro resto de aminoácido) y/o el efecto adverso de proteínas IND negativas dominantes sobre otras proteínas IND funcionales y/o parcialmente funcionales.

- 5 La expresión “proteína IND mutante”, como se usa aquí, se refiere a una proteína IND codificada por una secuencia de ácido nucleico *IND* mutante (“alelo *ind*”), por lo que la mutación da como resultado una actividad IND significativamente reducida y/o ninguna actividad IND *in vivo*, en comparación con la actividad de la proteína IND codificada por una secuencia *IND* de tipo salvaje no mutante (“alelo *IND*”).

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

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

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

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

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

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

Para los fines de esta invención, la "identidad de secuencia" de dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos relacionadas, expresada como un porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias óptimamente alineadas que tienen restos idénticos ( $\times 100$ ) dividido entre el número de posiciones comparadas. Un espacio, es decir, una posición en un alineamiento en el que un resto está presente en una secuencia pero no en la otra, se considera como una posición con restos no idénticos. El "alineamiento óptimo" de dos secuencias se encuentra alineando las dos secuencias a lo largo de toda la longitud según el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J Mol Biol* 48(3):443-53) en The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS, Rice et al., 2000, *Trends in Genetics* 16(6): 276-277; véase, por ejemplo, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) usando ajustes por defecto (penalización de apertura de espacio = 10 (para nucleótidos)/10 (para proteínas) y penalización de extensión del espacio = 0,5 (para nucleótidos)/0,5 (para proteínas)). Para nucleótidos, la matriz de puntuación por defecto usada es EDNAFULL, y para proteínas, la matriz de puntuación por defecto es EBLOSUM62.

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

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

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

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

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

"Productividad cosechada incrementada" o "productividad incrementada de semillas o granos" se refiere a la mayor cantidad de semilla o grano cosechada de una pluralidad de plantas, que comprenden cada una alelos IND mutantes según la invención, cuando se compara con la cantidad de semilla o grano cosechada de un número similar de plantas isogénicas sin los alelos IND mutantes. La productividad se expresa típicamente en unidades de volumen de semilla cosechada por unidades de superficie, tal como bushels/acre o kg/ha. El incremento de la productividad se expresa típicamente en porcentaje, por lo que la productividad de la planta de referencia o de control se refiere como 100% y la productividad de las plantas según las invenciones se expresa en % con respecto a la productividad de la

planta de control. Los incrementos de productividad observados en plantas de *Brassica* según la invención oscilaron desde al menos 101% hasta al menos 124%, y se espera que sean factibles mayores incrementos de la productividad. El incremento de la productividad también puede oscilar desde 104% hasta 108%, o 105% hasta 110%.

## 5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se describe en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), se encontró antes que plantas de *Brassica napus*, que son homocigotas para un alelo *ind* totalmente genosuprimido en solamente uno de sus dos genes *IND*, es decir, en *IND-A1* o *IND-C1*, no mostraron un incremento significativo en la resistencia al desgranado de las vainas en comparación con plantas de *Brassica napus* que no comprenden alelos *IND* mutantes, mientras que en plantas de *Brassica napus*, que fueron homocigotas para un alelo *ind* totalmente genosuprimido en ambos genes *IND*, la resistencia al desgranado de las vainas se incrementó significativamente, pero el nivel de resistencia al desgranado de las vainas fue demasiado elevado para mantener una capacidad de trilla agronómicamente relevante. Por el contrario, la resistencia al desgranado de las vainas se incrementó significativamente en plantas de *Brassica napus* que comprenden tres alelos *ind* totalmente genosuprimidos de los dos genes *IND* de *Brassica napus*, hasta un nivel mediante el cual las plantas mantienen una capacidad de trilla agronómicamente relevante de las vainas.

Los inventores encontraron sorprendentemente que también se pueden obtener plantas de *Brassica napus* con un fenotipo de desgranado de la vaina similar a las plantas de *Brassica* descritas en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), es decir, que combinan una resistencia incrementada al desgranado de la vaina con una capacidad de trilla agronómicamente relevante de las vainas, combinando dos alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos con dos alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos, en lugar de combinar tres alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos. Se encontró además que las mutaciones en el gen *IND-C1* dieron como resultado un incremento más fuerte en la resistencia al desgranado de la vaina que las mutaciones en el gen *IND-A1*. Por ejemplo, se observó un incremento más fuerte en la resistencia al desgranado de la vaina en plantas de *Brassica napus* cuando los dos alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos fueron alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos procedentes del gen *IND-C1* y los dos alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos fueron alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos procedentes del gen *IND-A1* que cuando los dos alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos procedieron del gen *IND-A1* y los alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos procedieron del gen *IND-C1*. Sorprendentemente, también se pudieron obtener plantas de *Brassica napus* que combinan una mayor resistencia al desgranado de la vaina con una capacidad de trilla agronómicamente relevante de las vainas al introducir dos alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos, en particular del gen *IND-C1*, solos.

De este modo, en una realización de la invención, se proporciona aquí una planta de *Brassica napus* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular una planta de *Brassica napus* que comprende un gen *IND-A1* y un gen *IND-C1*, caracterizada por que comprende dos alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos en su genoma, en particular de un gen *IND-A1* y/o un gen *IND-C1*, preferiblemente de un gen *IND-C1*, en la que dicho alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido es un alelo *IND* que produce una proteína *IND* en la que al menos un aminoácido seleccionado del aminoácido en una posición que corresponde a la posición 124 de SEC ID NO: 2, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 146 de SEC ID NO: 2, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 159 de SEC ID NO: 2, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 136 de SEC ID NO: 4, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 139 de SEC ID NO: 4, o el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 142 de SEC ID NO: 4, se sustituye por otro aminoácido, de manera que la actividad biológica de la proteína *IND* producida se reduce pero no se anula completamente en comparación con la proteína *IND* funcional de tipo salvaje correspondiente, mediante lo cual los alelos *ind* dan como resultado una cantidad significativamente reducida de proteína *IND* funcional del tipo codificado por el equivalente de tipo salvaje de estos alelos mutantes, y de este modo una cantidad significativamente reducida global de las proteínas *IND* funcionales producidas en las células de la planta, específicamente en las vainas de semillas en desarrollo, *in vivo*.

En otra realización, la planta de *Brassica* comprende además dos alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos en su genoma, en particular de un gen *IND-C1* y/o un *IND-A1*, respectivamente, preferiblemente de un gen *IND-C1*, tal como los descritos en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), por ejemplo *ind-a1-ems01*, *ind-a1-ems05*, *ind-c1-ems01*, o *ind-c1-ems03*, y similares.

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



De este modo, en otra realización de la invención, se proporciona una planta, en particular una planta de *Brassica*, que comprende al menos un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido, que codifica una proteína *IND* parcialmente funcional, tal como los descritos más abajo, por ejemplo *ind-a1-ems06*, *ind-a1-ems09*, *ind-a1-ems13*, *ind-c1-ems04*, *ind-c1-ems08*, or *ind-c1-ems09*, y similares, mientras que los alelos restantes pueden ser alelos *IND* parcialmente genosuprimidos, totalmente genosuprimidos y/o de tipo salvaje.

Se proporciona la planta de *Brassica napus* según la invención que comprende al menos dos genes *IND*, puede comprender dos alelos *ind* parcialmente genosuprimidos y n-tuplos alelos *ind* totalmente genosuprimidos de los dos genes *IND* en esa planta de *Brassica*, en particular de los genes *IND-A1* y/o *IND-C1* de *Brassica napus*, preferiblemente el gen *IND-C1*, por lo cual  $n \leq 2$  (por ejemplo  $n = 0, 1, \text{ o } 2$ ), de manera que al menos un alelo produce proteína *IND* al menos parcialmente funcional.

En un aspecto adicional de la invención una planta de un solo mutante *IND* homocigota ( $n = 2$ , es decir, homocigota para un alelo mutante parcialmente genosuprimido de un gen *IND*) y/o una planta mutante doble *IND* homocigota ( $n = 4$ , es decir, homocigota para un alelo mutante total y/o parcialmente genosuprimido de dos genes *IND*) de una especie de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular de *Brassica napus*, mediante lo cual los alelos mutantes son alelos mutantes de los dos genes *IND* en esa planta de *Brassica*, en particular de los genes *IND-A1* y/o *IND-C1*. Tales plantas mutantes se pueden usar con fines reproductivos.

Es adecuada para la invención, una planta de *Brassica napus* mutante parcialmente genosuprimido individual *IND* homocigótica, en la que el genotipo de la planta se puede describir como *ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup> IND-C1*, o *IND-A1/IND-A1, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>*. También es adecuada una planta de *Brassica napus* mutante parcial doble *IND* homocigota, en la que el genotipo de la planta se puede describir como *ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>*. También es adecuada una planta de *Brassica napus* mutante parcial y totalmente doble *IND* homocigota, en la que el genotipo de la planta se puede describir como *ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>P</sup> ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup> o ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>*.

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

Las plantas de *Brassica* descritas aquí, que muestran desgranado reducido o retrasado de las semillas, tienen un incremento en la productividad de semilla cosechada. Sin embargo, se observó que no solamente la productividad de semilla cosechada de plantas de *Brassica* que comprenden solamente el alelo *ind-c1-09* en estado homocigoto (que muestran un fenotipo de desgranado de la semilla retrasado o reducido observable), pero también la productividad de semilla cosechada de otras plantas de *Brassica* que comprenden solamente dos alelos *IND* mutantes en estado homocigótico, es decir, en las que el genotipo de la planta se puede describir como *ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, IND-C1/IND-C1, o IND-A1/IND-A1, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>*, también aumentó significativamente, cuando se compara con plantas de *Brassica* isogénicas que no comprenden los alelos *IND* mutantes, a pesar de la ausencia de un fenotipo de desgranado de semillas reducido o retrasado observable en las plantas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* mutantes. La invención proporciona también de este modo plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en las que al menos dos alelos producen una proteína *IND* funcional, plantas las cuales tienen una mayor productividad de semillas. Estará claro que los dos alelos mutantes en el locus *IND-A* o en el locus *IND-C* pueden ser el mismo alelo mutante o un alelo mutante diferente.

#### Secuencias de ácidos nucleicos

Se describen tanto secuencias de ácidos nucleicos *ind* mutantes parcialmente genosuprimidos que codifican proteínas *IND* parcialmente funcionales, es decir, proteínas *IND* con una actividad biológica significativamente reducida (es decir, secuencias de ácidos nucleicos *IND* que comprenden una o más mutaciones, que dan como resultado una actividad biológica significativamente reducida de la proteína *IND* codificada) de genes *IND* de *Brassicaceae*, particularmente de la especie de *Brassica*, especialmente de *Brassica napus*, pero también de otras especies de cultivo de *Brassica*. Por ejemplo, la especie de *Brassica* que comprende un genoma A y/o C puede comprender alelos de los genes *IND-A1* o *IND-C1*, que son esencialmente similares a los alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos de la presente invención y que se pueden identificar y combinar en una única planta según la invención. Además, se pueden usar métodos de mutagénesis para generar mutaciones en los alelos *IND* de tipo salvaje, generando de ese modo alelos *ind* mutantes esencialmente similares a los alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos de la presente invención para uso según la invención. Debido a que los alelos *IND* específicos se combinan preferiblemente en una planta mediante cruce y selección, las secuencias de ácidos nucleicos *ind* se pueden proporcionar en una planta (es decir, endógenamente), por ejemplo, una planta de *Brassica*, preferiblemente una planta de *Brassica* que se puede cruzar con *Brassica napus* o que se puede usar para

obtener una planta de *Brassica napus* "sintética". La hibridación entre diferentes especies de *Brassica* se describe en la técnica, por ejemplo, como se cita en Snowdon (2007, Chromosome research 15: 85-95). La hibridación interespecífica se puede usar, por ejemplo, para transferir genes desde, por ejemplo, el genoma C en *B. napus* (AACC) al genoma C en *B. carinata* (BBCC), o incluso, por ejemplo, desde el genoma C en *B. napus* (AACC) al genoma B en *B. juncea* (AABB) (mediante el suceso esporádico de recombinación ilegítima entre sus genomas C y B). Las líneas de *Brassica napus* "resintetizadas" o "sintéticas" se pueden producir cruzando los ancestros originales, *B. oleracea* (CC) y *B. rapa* (AA). Las barreras de incompatibilidad interespecífica, y también intergenérica, se pueden superar con éxito en cruces entre especies de cultivo de *Brassica* y sus parientes, por ejemplo, mediante técnicas de rescate de embriones o mediante fusión de protoplastos (véase, por ejemplo, Snowdon, anteriormente).

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

10 Las nuevas secuencias de ácidos nucleicos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos de *IND-A1* e *IND-C1* de tipo salvaje se han aislado de *Brassica napus*. En SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 7 del listado de secuencias se dan las secuencias *IND* de tipo salvaje como se describen en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), mientras que las nuevas secuencias *ind* mutantes parcialmente genosuprimidas de estas secuencias, y de secuencias esencialmente similares a estas, se describen aquí más abajo y en los Ejemplos, con referencia a las secuencias *IND* de tipo salvaje. El ADN genómico que codifica la proteína *IND* de *Brassica napus* no comprende ningún intrón.

15 "Secuencias de ácidos nucleicos *IND-A1*" o "secuencias de ácidos nucleicos variantes *IND-A1*", según la invención, son secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2, secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 5. Estas secuencias de ácidos nucleicos también se pueden citar aquí como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias *IND* proporcionadas en el listado de secuencias.

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

25 De este modo, se describen nuevas secuencias de ácidos nucleicos mutantes parcialmente genosuprimidos de secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas *IND-A1* e *IND-C1* funcionales, de tipo salvaje, incluyendo variantes y fragmentos de las mismas (como se definen adicionalmente más abajo), mediante lo cual la mutación en la secuencia de ácido nucleico da como resultado preferiblemente que se inserte, suprima o sustituya uno o más aminoácidos, en comparación con la proteína *IND* de tipo salvaje, en particular que se sustituya uno o más aminoácidos, y con lo que la actividad biológica de la proteína *IND* se reduce significativamente. Una reducción significativa de la actividad biológica de la proteína *IND* se refiere aquí a una reducción de la actividad de unión a ADN, la capacidad de dimerización y/o la actividad reguladora transcripcional de la proteína *IND*, de manera que se incrementa la resistencia al desgranado de las vainas de una planta que expresa la proteína *IND* mutante en comparación con una planta que expresa la proteína *IND* de tipo salvaje correspondiente.

30 Para determinar la funcionalidad de un alelo/proteína *IND* específico en plantas, particularmente en plantas de *Brassica*, se puede determinar el nivel de resistencia al desgranado de las vainas en las plantas llevando a cabo ensayos macroscópicos, microscópicos e histológicos sobre frutos y flores de las plantas que comprenden el alelo/proteína *IND* específicos y de plantas de tipo salvaje correspondientes, análogos a los ensayos llevados a cabo sobre frutos y flores de *Arabidopsis* como describen Liljegren et al. (2004, más arriba), o como se describe en los Ejemplos más abajo. De forma breve, los cambios en la resistencia al desgranado de las vainas se pueden evaluar y/o medir, por ejemplo, mediante ensayos macroscópicos, tal como inspección de las vainas de semillas a simple vista para evaluar, por ejemplo, la presencia o ausencia de los márgenes de la valva, la longitud del pico de las vainas, etc.; un ensayo de impacto manual (MIT) para comparar el nivel de resistencia al desgranado de las vainas entre diferentes líneas *IND* mutantes y las líneas de tipo salvaje correspondientes evaluando la facilidad de apertura de las vainas al retorcer suavemente las vainas; un ensayo de impactos aleatorios (RIT) para comparar la capacidad

de trilla de las vainas de semillas de plantas de diferentes líneas *IND* mutantes y las líneas de tipo salvaje correspondientes, respectivamente, midiendo la semivida de las muestras de vainas de estas líneas; y/o mediante ensayos microscópicos para examinar, por ejemplo, si y cómo las células en el margen de la valva y en la zona de dehiscencia de vainas de semillas se ven afectadas por mutaciones en *IND*. Una vez que se identifica y caracteriza la pareja de dimerización de la proteína *IND* (por ejemplo, la propia proteína *IND* en caso de que su funcionamiento dependa de la formación de un homodímero, u otra proteína en caso de que su funcionamiento dependa de la formación de un heterodímero) y/o el gen o genes cuya transcripción está regulada por la proteína *IND*, la funcionalidad de un alelo/proteína *IND* específicos se puede evaluar como alternativa mediante técnicas de ADN recombinante como se conocen en la técnica, por ejemplo, coexpresando ambas parejas del dímero en una célula hospedante (por ejemplo, una bacteria, tal como *E. coli*) y evaluando si todavía se pueden formar dímeros, si los dímeros todavía se pueden unir al sitio de unión a bHLH del gen o genes regulados, y/o si la transcripción de este gen o genes todavía está regulada por esta unión.

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

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

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

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

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

#### Secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas *IND* mutantes

Se describen secuencias de ácidos nucleicos que comprenden una o más supresiones, inserciones o sustituciones nucleotídicas con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos *IND* de tipo salvaje representadas en SEC ID NO: 1, 3, 5 y 7 del listado de secuencia, en las que la mutación o mutaciones en la secuencia de ácido nucleico da como resultado una actividad biológica significativamente reducida, es decir, una genosupresión parcial de la actividad biológica, de la proteína *IND* codificada con respecto a la proteína *IND* de tipo salvaje, así como fragmentos de tales moléculas de ácidos nucleicos mutantes. Tales secuencias de ácidos nucleicos mutantes (denominadas secuencias *ind<sup>P</sup>*) se pueden generar y/o identificar usando diversos métodos conocidos, como se describen adicionalmente más abajo. Nuevamente, tales moléculas de ácidos nucleicos se describen tanto en forma endógena como en forma aislada.

Básicamente, cualquier mutación en las secuencias de ácidos nucleicos *IND* de tipo salvaje que da como resultado una proteína *IND* que comprende al menos una inserción, supresión y/o sustitución de aminoácido con respecto a la proteína *IND* de tipo salvaje puede conducir a una actividad biológica significativamente reducida o a ninguna actividad biológica. Sin embargo, se entiende que es más probable que ciertas mutaciones en la proteína *IND* den como resultado una anulación completa de la actividad biológica de la proteína *IND*, tales como mutaciones a través de las cuales faltan porciones de los dominios funcionales, tales como el dominio de unión a ADN (“b”), el dominio de dimerización (“HLH”) y/o los dominios reguladores de la transcripción, o por las cuales ciertos restos de aminoácidos críticos en estos dominios, tales como los aminoácidos Gln (Q), Ala (A) y Arg (R) en la posición 5, 9, y 13 o los restos de aminoácidos básicos (en particular los restos de Arg (R)) en las posiciones 10 y 12 de la secuencia del dominio bHLH de consenso definida por Heim et al. (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747; que corresponde a las posiciones 123, 127 y 131, y 128 y 130, respectivamente, en SEC ID NO: 10, véase la Tabla 1) faltan o están sustituidos, preferiblemente por aminoácidos no similares o no conservativos, mientras que es más probable que otras mutaciones en la proteína *IND* den como resultado una reducción significativa de la actividad biológica de la proteína *IND*, tales como las mutaciones que conducen a sustituciones de aminoácidos específicos, por ejemplo los aminoácidos conservados indicados en la Tabla 1, que provocan una unión al ADN menos eficiente, una dimerización menos eficiente, y/o una regulación menos eficiente de la transcripción sin anular completamente la actividad biológica de la proteína *IND* codificada. El documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052) describe, por ejemplo, alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos, en particular *ind-a1-ems01*, *ind-c1-ems01* y *ind-c1-ems03*, que comprenden una mutación sin sentido que da como resultado la producción de proteínas *IND* truncadas que carecen del dominio bHLH, y alelos *IND* mutantes totalmente genosuprimidos, en particular *ind-a1-ems05*, que codifican una proteína *IND* mutante en la que el Arg conservado en la posición 10 del dominio bHLH de consenso se sustituye por un His aromático, mientras que la presente invención describe alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos, en particular, por ejemplo, *ind-c1-ems09*, que codifican una proteína *IND* mutante en la que el Ala conservado en la posición 9 del dominio bHLH de consenso se sustituye por un Thr, y *ind-c1-ems04*, que codifica una proteína *IND* mutante en la que el Arg conservado en la posición 12 del dominio bHLH de consenso se sustituye por un Cys.

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

- una “mutación de sentido erróneo”, que es un cambio en la secuencia de ácido nucleico que da como resultado la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido;
- una “mutación sin sentido” o “mutación de codón STOP”, que es un cambio en la secuencia de ácido nucleico que da como resultado la introducción de un codón STOP prematuro y de este modo la terminación de la traducción (dando como resultado una proteína truncada); los genes vegetales contienen los codones de parada de la traducción “TGA” (UGA en ARN), “TAA” (UAA en ARN) y “TAG” (UAG en ARN); de este modo, cualquier sustitución, inserción, supresión nucleotídica que dé como resultado uno de estos codones en el ARNm maduro que se está traduciendo (en el marco de lectura) terminará la traducción;
- una “mutación de inserción” de uno o más aminoácidos, debido a que se ha añadido uno o más codones en la secuencia codificante del ácido nucleico;
- una “mutación de supresión” de uno o más aminoácidos, debido a que se ha suprimido uno o más codones en la secuencia codificante del ácido nucleico;
- una “mutación de desplazamiento del marco de lectura”, que da como resultado que la secuencia de ácido nucleico se traduzca en un marco diferente en dirección 3’ de la mutación. Una mutación de desplazamiento del marco de lectura puede tener diversas causas, tales como la inserción, supresión o duplicación de uno o más nucleótidos.

La Tabla 1 indica la longitud de la proteína *IND* de *Arabidopsis* en SEC ID NO: 10, del ADN que codifica *IND* de *Arabidopsis* en SEC ID NO: 9, y de las proteínas *IND-A1* e *IND-C1* de *Brassica napus* en SEC ID NO: 2 y 6 y SEC ID NO: 4 y 8, respectivamente; la posición de los dominios bHLH en las proteínas *IND-A1* e *IND-C1* de *Brassica napus* basada en la posición indicada del dominio pfam PF00010, dominio smart SM00353, dominio prosite PS50888 y dominio superfam G3D.4.10.280.10 o SSF47459 de la proteína *IND* de *Arabidopsis* según la base de datos de The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>; locus At4g00120.1; SEC ID NO: 10); la posición de los dominios bHLH y los aminoácidos conservados en las proteínas *IND-A1* e *IND-C1* de *Brassica napus* basada en la posición indicada de dominio bHLH y aminoácidos conservados en la proteína *IND* de *Arabidopsis* según Heim et al. (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747), según Toledo-Ortiz et al. (2003, Plant Cell 15: 1749-1770), y según Liljegren et al. (2004, Cell, 116, 843-853); como se describe adicionalmente en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052).

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

ES 2 604 317 T3

		AtIND1 (SEC ID NO: 10)	AtIND1 (SEC ID NO: 9)	BnIND-A1 (SEC ID NO: 2/6)	BnIND-C1a/b (SEC ID 4/8 de 16-210 / SEC ID 4/8)
Región codificante	TAIR:	1-198 (198 AA)	1-594	1-185	16-210 / 1-210
	PF00010	121-168	361-504	120-167	133-180
	SM00353	124-173	370-519	123-172	136-185
	PS50888	112-168	334-504	111-167	124-180
	G3D.4.10.280.10	114-196	340-588	-	127-208
	SSF47459	114-198	340-594	-	127-210
	Liljegren et al.	30-198 (169 AA)	88-594		
bHLH:	Heim et al.	119-174	355-523	118-173	131-186
	Toledo-Ortiz et al.	115-167	343-501	114-166	127-179
	Liljegren et al.	119-167	355-501	118-166	131-179
b	Heim et al.	119-131	355-393	118-132	131-145
	Toledo-Ortiz et al.	115-131	343-393	114-132	127-145
	Liljegren et al.	119-131	355-393	118-132	131-145
H1	Heim et al.	132-146	394-438	133-145	146-158
	Toledo-Ortiz et al.	132-146	394-438	133-145	146-158
	Liljegren et al.	132-145	394-435	133-144	146-157
L	Heim et al.	147-152	439-456	146-151	159-164
	Toledo-Ortiz et al.	147-152	439-456	146-151	159-164
	Liljegren et al.	146-152	436-456	145-151	158-164
H2	Heim et al.	153-174	457-523	152-173	165-186
	Toledo-Ortiz et al.	153-167	457-501	152-166	165-179
	Liljegren et al.	153-167	457-501	152-166	165-179
AA conservados	N (1 <sup>T</sup> )	115	343-345	114	127
	V (2 <sup>I</sup> )	116	346-348	115	128
	Q (5 <sup>H</sup> )	123	367-379	122	135
	A (9 <sup>H</sup> - 13 <sup>T</sup> )	127	379-381	126	139
	R (10 <sup>H</sup> - 14 <sup>I</sup> )	128	382-384	127	140
	R (12 <sup>H</sup> - 16 <sup>I</sup> )	130	388-390	129	142
	R (13 <sup>H</sup> )	131	391-393	130	143

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

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

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

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

Una mutación sin sentido en un alelo *IND*, como se usa aquí, es una mutación en un alelo *IND* mediante la cual se introducen uno o más codones de parada de la traducción en el ADN codificante y la secuencia de ARNm correspondiente del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente. Los codones de parada de la traducción son TGA (UGA en el ARNm), TAA (UAA) y TAG (UAG). De este modo, cualquier mutación (supresión, inserción o sustitución) que conduzca a la generación de un codón de parada en el marco en la secuencia codificante dará como resultado la terminación de la traducción y el truncamiento de la cadena de aminoácidos. Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación sin sentido en la que se introduce un codón de parada en el marco en la secuencia del codón *IND* mediante una sustitución de un solo nucleótido, tal como la mutación de CAG a TAG, TGG a TAG, TGG a TGA, o CAA a TAA. Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación sin sentido en la que se introduce un codón de parada en el marco en la secuencia del codón *IND* mediante sustituciones de dos nucleótidos, tales como la mutación de CAG a TAA, TGG a TAA, o CGG a TAG o TGA. Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación sin sentido en la que se introduce un codón de parada en el marco en la secuencia del codón *IND* mediante sustituciones de tres nucleótidos, tal como la mutación de CGG a TAA. La proteína truncada carece de los aminoácidos codificados por el ADN codificante en dirección 3' de la mutación (es decir, la parte C-terminal de la proteína *IND*), y mantiene los aminoácidos codificados por el ADN codificante en dirección 5' de la mutación (es decir, la parte N-terminal de la proteína *IND*). Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación sin sentido presente en cualquier parte delante del resto de Leu conservado del dominio H2 (en la posición 56 en la secuencia del dominio de bHLH de consenso como describen Heim et al., 2003, véase la Tabla 1), de manera que falta al menos el resto de Leu conservado. Cuanto más truncada esté la proteína *IND* mutante en comparación con la proteína *IND* de tipo salvaje, mejor puede el truncamiento dar como resultado una actividad significativamente reducida de la proteína *IND*. Se cree que, a fin de que la proteína *IND* mutante retenga cierta actividad biológica, debería comprender al menos el dominio de unión a ADN (b). De este modo, un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación sin sentido que da como resultado una proteína truncada de menos de alrededor de 170 aminoácidos (que carece de Leu conservado), menos de alrededor de 150 aminoácidos (que carece del dominio H2), menos de alrededor de 145 aminoácidos (que carece de los dominios L y H2), o menos de alrededor de 130 aminoácidos (que carece del dominio de HLH) (véase la Tabla 1).

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

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

Posición de aminoácidos	Posición del nucleótido	codón tipo salvaje → mutante	aminoácido tipo salvaje → mutante
25	74	tgg → <u>ta</u> g	TRP → STOP
	75	tgg → tga <u>g</u>	TRP → STOP
	74+75	tgg → <u>taa</u>	TRP → STOP
57	169	<u>ca</u> g → <u>ta</u> g	GLN → STOP
	169+171	<u>ca</u> g → <u>taa</u>	GLN → STOP
91	271	<u>ca</u> a → <u>ta</u> a	GLN → STOP
98	292	<u>ca</u> g → <u>ta</u> g	GLN → STOP
	292+294	<u>ca</u> g → <u>taa</u>	GLN → STOP
122	364	<u>ca</u> g → <u>ta</u> g	GLN → STOP
	364+366	<u>ca</u> g → <u>taa</u>	GLN → STOP
128	382+383	<u>cg</u> g → <u>ta</u> g	ARG → STOP

ES 2 604 317 T3

Posición de aminoácidos	Posición del nucleótido	codón tipo salvaje → mutante	aminoácido tipo salvaje → mutante
	382+384	<u>c</u> gg → <u>t</u> ga	ARG → STOP
	382+383+384	<u>c</u> gg → <u>t</u> aa	ARG → STOP
138	412+413	<u>c</u> gg → <u>t</u> ag	ARG → STOP
	412+414	<u>c</u> gg → <u>t</u> ga	ARG → STOP
	412+413+414	<u>c</u> gg → <u>t</u> aa	ARG → STOP
168	502+503	<u>c</u> gg → <u>t</u> ag	ARG → STOP
	502+504	<u>c</u> gg → <u>t</u> ga	ARG → STOP
	502+503+504	<u>c</u> gg → <u>t</u> aa	ARG → STOP
169	505	<u>c</u> ag → <u>t</u> ag	GLN → STOP
	505+507	<u>c</u> ag → <u>t</u> aa	GLN → STOP
181	542	<u>t</u> gg → <u>t</u> ag	TRP → STOP
	543	<u>t</u> gg → <u>t</u> ga	TRP → STOP
	542+543	<u>t</u> gg → <u>t</u> aa	TRP → STOP

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

Posición de aminoácidos	Posición del nucleótido	codón tipo salvaje → mutante	aminoácido tipo salvaje → mutante
41	122	<u>t</u> gg → <u>t</u> ag	TRP → STOP
	123	<u>t</u> gg → <u>t</u> ga	TRP → STOP
	122+123	<u>t</u> gg → <u>t</u> aa	TRP → STOP
50	148	<u>c</u> aa → <u>t</u> aa	GLN → STOP
73	271	<u>c</u> ag → <u>t</u> ag	GLN → STOP
	271+272	<u>c</u> ag → <u>t</u> aa	GLN → STOP
104	310	<u>c</u> aa → <u>t</u> aa	GLN → STOP
111	331	<u>c</u> ag → <u>t</u> ag	GLN → STOP
	331+333	<u>c</u> ag → <u>t</u> aa	GLN → STOP
135	403	<u>c</u> ag → <u>t</u> ag	GLN → STOP
	403+405	<u>c</u> ag → <u>t</u> aa	GLN → STOP
141	421+422	<u>c</u> gg → <u>t</u> ag	ARG → STOP
	421+423	<u>c</u> gg → <u>t</u> ga	ARG → STOP
	421+422+423	<u>c</u> gg → <u>t</u> aa	ARG → STOP
151	451+452	<u>c</u> gg → <u>t</u> ag	ARG → STOP
	451+453	<u>c</u> gg → <u>t</u> ga	ARG → STOP
	451+452+453	<u>c</u> gg → <u>t</u> aa	ARG → STOP



Posición de aminoácidos	Posición del nucleótido	codón tipo salvaje → mutante	aminoácido tipo salvaje → mutante
181	541+542	cgg → tag	ARG → STOP
	541+543	cgg → tga	ARG → STOP
	541+542+543	cgg → taa	ARG → STOP
182	544	cag → tag	GLN → STOP
	544+546	cag → taa	GLN → STOP
187	559	cag → tag	GLN → STOP
	559+561	cag → taa	GLN → STOP
191	571	cag → tag	GLN → STOP
	571+573	cag → taa	GLN → STOP

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

- 5 Una mutación de sentido erróneo en un alelo *IND*, como se usa aquí, es cualquier mutación (supresión, inserción o sustitución) en un alelo *IND* mediante la cual se cambian uno o más codones en el ADN codificante y la secuencia de ARNm correspondiente del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente, dando como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos en la proteína *IND* de tipo salvaje por uno o más aminoácidos distintos en la proteína *IND* mutante. Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación de sentido erróneo que da como resultado una sustitución de un resto de valina (Val) en la posición 124 de la proteína *IND* en SEC ID NO: 2, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de metionina (Met), tal como el alelo *ind-a1-EMS06* (Tabla 3a). Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación de sentido erróneo que da como resultado una sustitución de un resto de glicina (Gly) en la posición 146 de la proteína *IND* en SEC ID NO: 2, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de serina (Ser), tal como el alelo *ind-a1-EMS09* (Tabla 3a). Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación de sentido erróneo que da como resultado una sustitución de un resto de alanina (Ala) en la posición 159 de la proteína *IND* en SEC ID NO: 2, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de valina (Val), tal como el alelo *ind-a1-EMS13* (Tabla 3a). Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación de sentido erróneo que da como resultado una sustitución de un resto de treonina (Thr) en la posición 136 de la proteína *IND* en SEC ID NO: 4, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de metionina (Met), tal como el alelo *ind-c1-EMS08* (Tabla 3b). Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación de sentido erróneo que da como resultado una sustitución de un resto de alanina (Ala) en la posición 139 de la proteína *IND* en SEC ID NO: 4, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de treonina (Thr), tal como el alelo *ind-c1-EMS09* (Tabla 3b). Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido puede comprender una mutación de sentido erróneo que da como resultado una sustitución de un resto de arginina (Arg) en la posición 142 de la proteína *IND* en SEC ID NO: 4, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de cisteína (Cys), tal como el alelo *ind-c1-EMS04* (Tabla 3b). Las semillas de referencia que comprenden los alelos *ind-a1-EMS06*, *ind-a1-EMS09*, *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS08*, *ind-c1-EMS09*, e *ind-c1-EMS04* en estado homocigoto se han depositado en el NCIMB Limited (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Scotland, AB21 9YA, UK) el 7 de julio de 2008, con el número de acceso NCIMB 41570, NCIMB 41571, NCIMB 41572, NCIMB 41573, NCIMB 41574, y NCIMB 41575, respectivamente.

Tabla 3a: Mutaciones de sentido erróneo en *IND-A1*

Posición de aminoácidos	Posición del nucleótido	codón tipo salvaje → mutante	aminoácido tipo salvaje → mutante	Nombre del alelo	Número del depósito
<i>SEC ID: 2/6</i>	<i>SEC ID: 1</i>	<i>SEC ID: 5</i>			
124	370	930	gtg → atg	<i>ind-a1-EMS06</i>	NCIMB 41570
146	436	996	ggc → agc	<i>ind-a1-EMS09</i>	NCIMB 41571

Posición de aminoácidos	de	Posición del nucleótido	del	codón tipo salvaje → mutante	aminoácido tipo salvaje → mutante	Nombre del alelo	Número del depósito
159*		476	1036	gcc → gtc	ALA → VAL	<i>ind-al-EMS13</i>	NCIMB 41572

Tabla 3b: Mutaciones de sentido erróneo en *IND-C1*

Posición de aminoácidos	de	Posición del nucleótido	del	codón tipo salvaje → mutante	aminoácido tipo salvaje → mutante	Nombre del alelo	Número del depósito
<i>SEC ID: 4/8</i>		<i>SEC ID: 3</i>	<i>SEC ID: 7</i>				
136		407	903	acg → atg	THR → MET	<i>ind-cl-EMS08</i>	NCIMB 41573
139*		415	911	gct → act	ALA → THR	<i>ind-cl-EMS09</i>	NCIMB 41574
142*		424	920	cgt → tgt	ARG → CYS	<i>ind-cl-EMS04</i>	NCIMB 41575

- 5 Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido que comprende una mutación de sentido erróneo puede codificar una proteína *IND* en la que está o están sustituidos uno o más de los aminoácidos conservados indicados anteriormente o en la Tabla 1, tales como los alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS04* e *ind-c1-EMS09* (indicados con \* en la Tabla 3). Como se describe en Heim et al. (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747), Toledo-Ortiz et al. (2003, Plant Cell 15: 1749-1770), Liljegren et al. (2004, Cell, 116, 843-853), y en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), algunos de los aminoácidos conservados son más críticos para la actividad biológica de la proteína *IND* que otros. De este modo, por ejemplo, es más probable que las mutaciones de sentido erróneo que dan como resultado la sustitución de, por ejemplo, los aminoácidos en la posición 5, 9 (por ejemplo, *ind-c1-EMS09*), y 13, o en las posiciones 10 (por ejemplo, *ind-al-EMS05*) y 12 (por ejemplo, *ind-c1-EMS04*) de la secuencia del dominio de bHLH de consenso definida por Heim et al. (más arriba), den como resultado una actividad significativamente reducida, debido a una capacidad reducida para unirse al ADN diana, de la proteína *IND*. De forma similar, es más probable que las mutaciones de sentido erróneo que dan como resultado la sustitución de, por ejemplo, los aminoácidos en la posición 16, 20, 23, 27 en la hélice 1 o en las posiciones 36, 39, 43, 49 (por ejemplo, *ind-a1-EMS13*), 53, y 56 en la hélice 2 de la secuencia del dominio de bHLH de consenso definida por Heim et al. (más arriba) den como resultado una actividad significativamente reducida, debido a una capacidad de dimerización reducida, de la proteína *IND*.
- 20 Un alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido que comprende una mutación de sentido erróneo que se puede usar según la invención es un alelo *IND* mutante que comprende una mutación de sentido erróneo también puede ser un alelo *IND* que comprende una mutación de sentido erróneo que corresponde a la mutación de sentido erróneo en los alelos *ind-1* parcialmente genosuprimidos de *Arabidopsis* (Liljegren et al., 2004, más arriba) (véase la Tabla 1).
- 25 Una mutación de desplazamiento del marco de lectura en un alelo *IND*, como se usa aquí, es una mutación (supresión, inserción duplicación y similar) en un alelo *IND* que da como resultado que la secuencia de ácido nucleico sea traducida en un marco diferente en dirección 3' de la mutación.

#### Secuencias de aminoácidos

- 30 Se describen secuencias de aminoácidos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidas (es decir, secuencias de aminoácidos *IND* que comprenden una o más mutaciones que dan como resultado una actividad biológica significativamente reducida de la proteína *IND*) de *Brassicaceae*, particularmente de especies de *Brassica*, especialmente de *Brassica napus*, pero también de otras especies de cultivo de *Brassica*. Por ejemplo, las especies de *Brassica* que comprenden un genoma A y/o un genoma C pueden codificar diferentes aminoácidos *IND-A1* o *IND-C1*, que son esencialmente similares a las nuevas proteínas *IND* mutantes parcialmente genosuprimidas de la presente invención. Además, se pueden usar métodos de mutagénesis para generar mutaciones en alelos *IND* de tipo salvaje, generando de ese modo alelos mutantes que pueden codificar otras proteínas *IND* mutantes que son esencialmente similares a las nuevas proteínas *IND* mutantes parcialmente genosuprimidas de la presente invención. Las secuencias de aminoácidos *IND* mutantes se describen en una planta de *Brassica* (es decir, endógenamente). Sin embargo, también se describen aquí secuencias de aminoácidos *IND* aisladas (por ejemplo, aisladas de la planta u obtenidas sintéticamente), así como sus variantes y fragmentos de cualquiera de estas.
- 40

5 Las secuencias de aminoácidos, que son esencialmente similares a las nuevas proteínas IND mutantes parcialmente genosuprimidas de la presente invención, se pueden obtener sustituyendo aminoácidos en las secuencias de aminoácidos IND parcialmente genosuprimidas de la presente invención por otros aminoácidos que tienen propiedades similares (tales como hidrofobia, hidrofilia, antigenicidad similares, propensión a formar o romper estructuras helicoidales  $\alpha$  o estructuras laminares  $\beta$ ). Las tablas de sustituciones conservativas son bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman y Company, y la Tabla 4 de la presente solicitud de patente).

Tabla 4: Ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservados

Resto	Sustituciones conservativas	Resto	Sustituciones conservativas
Ala	Ser	Leu	Ile, Val
Arg	Lys	Lys	Arg, Gln
Asn	Gln, His	Met	Leu, Ile
Asp	Glu	Phe	Met, Leu, Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr, Gly
Cys	Ser	Thr	Ser, Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp, Phe
His	Asn, Gln	Val	Ile, Leu
Ile	Leu, Val		

10 Las nuevas secuencias de aminoácidos IND mutantes parcialmente genosuprimidas de proteínas IND-A1 e IND-C1 de tipo salvaje se han aislado de *Brassica napus*. Las secuencias IND de tipo salvaje como se describen en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052) se representan en SEC ID NO: 2 y SEC ID NO: 4., mientras que las nuevas secuencias IND mutantes parcialmente genosuprimidas de estas secuencias, y de secuencias esencialmente similares a estas, se describen aquí más abajo y en los Ejemplos, con referencia a las secuencias IND de tipo salvaje. Como se describe anteriormente, las proteínas IND de tipo salvaje de *Brassica napus* tienen alrededor de 185-210 aminoácidos de longitud, y comprenden un número de dominios estructurales y funcionales.

15  
20 "Secuencias de aminoácidos IND-A1" o "secuencias de aminoácidos variantes IND-A1", según la invención, son secuencias de aminoácidos que tienen al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2. Estas secuencias de aminoácidos también se pueden citar como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias IND proporcionadas en el listado de secuencias.

25 "Secuencias de aminoácidos IND-C1" o "secuencias de aminoácidos variantes IND-C1", según la invención, son secuencias de aminoácidos que tienen al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 4 (IND-C1-larga) o con SEC ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 al aminoácido en la posición 210 (IND-C1-corta). Estas secuencias de aminoácidos también se pueden citar como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias IND proporcionadas en el listado de secuencias.

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

35  
40 Se describen aquí secuencias de aminoácidos tanto endógenas como aisladas. También se describen fragmentos de las secuencias de aminoácidos IND y secuencias de aminoácidos variantes IND definidas anteriormente. Un

“fragmento” de una secuencia de aminoácidos IND o variante de la misma (como se define), puede ser de diversas longitudes, tales como al menos 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 150, 175, 180 aminoácidos contiguos de la secuencia IND (o de la secuencia variante).

#### Secuencias de aminoácidos de proteínas IND funcionales

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

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

#### 15 Secuencias de aminoácidos de proteínas IND mutantes

La invención describe secuencias de aminoácidos que comprenden una o más supresiones, inserciones o sustituciones de aminoácidos con respecto a las secuencias de aminoácidos IND de tipo salvaje representadas en SEC ID NO: 2 y 4 del listado de secuencias, en las que la mutación o mutaciones en la secuencia de aminoácidos dan como resultado una actividad biológica significativamente reducida, es decir, una genosupresión parcial de la actividad biológica, de la proteína IND codificada con respecto a la proteína de tipo salvaje, así como también fragmentos de tales moléculas de aminoácidos mutantes. Tales secuencias de aminoácidos mutantes se pueden generar y/o identificar usando diversos métodos conocidos, como se describe anteriormente. Nuevamente, tales moléculas de aminoácidos se describen tanto en forma endógena como en forma aislada.

25 Como se describe anteriormente, básicamente, cualquier mutación en las secuencias de aminoácidos IND de tipo salvaje que dé como resultado una proteína IND que comprende al menos una inserción, supresión y/o sustitución de aminoácidos con respecto a la proteína IND de tipo salvaje puede conducir a actividad biológica significativamente reducida o a ninguna actividad biológica. Sin embargo, se entiende que es más probable que ciertas mutaciones en la proteína IND den como resultado una supresión total de la actividad biológica de la proteína IND, conduciendo tales mutaciones a proteínas truncadas, mediante lo cual faltan porciones significativas de los dominios funcionales, tales como el dominio de unión a ADN (“b”), el dominio de dimerización (“HLH”) y/o aminoácidos que son importantes en la regulación de la transcripción (véase la Tabla 1), o mutaciones por las cuales ciertos restos de aminoácidos críticos en estos dominios, tales como los aminoácidos Gln (Q), Ala (A) y Arg (R) en la posición 5, 9, y 13, o los restos de aminoácidos básicos (en particular restos de Arg (R)) en las posiciones 10 y 12 de la secuencia del dominio de bHLH de consenso definida por Heim *et al.* (más arriba; que corresponde a las posiciones 123, 127 y 131, y 128 y 130, respectivamente, en SEC ID NO: 10; véase la Tabla 1) faltan o están sustituidos, preferiblemente por aminoácidos no similares o no conservativos, mientras que otras mutaciones de la proteína más probablemente den como resultado una reducción significativa de la actividad biológica de la proteína IND, tales como mutaciones que conducen a sustituciones de aminoácidos específicos, por ejemplo los aminoácidos conservados indicados en la Tabla 1, que ocasionan una unión al ADN menos eficiente, una dimerización menos eficiente, y/o una regulación menos eficiente de la transcripción sin abolir completamente la actividad biológica de la proteína IND codificada.

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

50 También son adecuadas proteínas IND mutantes parcialmente genosuprimidas que están truncadas, con lo que el truncamiento da como resultado una proteína mutante que tiene actividad significativamente reducida *in vivo*. Tales proteínas IND truncadas son proteínas IND que carecen de dominios funcionales en la parte C-terminal de la proteína IND de tipo salvaje correspondiente y que mantienen la parte N-terminal de la proteína IND de tipo salvaje correspondiente. De este modo, se describe una proteína IND mutante parcialmente genosuprimida que comprende la parte N-terminal de la proteína IND de tipo salvaje correspondiente hasta, pero sin incluir, el resto de Leu conservado del dominio H2 (en la posición 56 en la secuencia del dominio de bHLH de consenso como describen Heim *et al.*, 2003, véase anteriormente). Cuanto más truncada está la proteína mutante en comparación con la proteína de tipo salvaje, más puede el truncamiento dar como resultado una actividad significativamente reducida de la proteína IND. Se cree que, a fin de que la proteína IND mutante retenga algo de actividad biológica, debería al menos comprender el dominio de unión a ADN (b). De este modo, también es adecuada una proteína IND mutante

parcialmente genosuprimida que comprende la parte N-terminal de la proteína IND de tipo salvaje correspondiente que carece de parte o de todo el dominio de la segunda H, y/o que carece de parte o de todo el dominio de L, y/o que carece de parte o de todo el dominio de la primera H (véase la Tabla 1).

5 Se describen proteínas IND mutantes parcialmente genosuprimidas que comprenden una o más mutaciones de sustitución, por las cuales la sustitución o sustituciones dan como resultado una proteína mutante que tiene actividad significativamente reducida *in vivo*. Una proteína IND mutante parcialmente genosuprimida puede comprender una mutación de sustitución que da como resultado la sustitución de un resto de valina (Val) en la posición 124 de la proteína IND en SEC ID NO: 2, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de metionina (Met), tal como la proteína IND mutante parcialmente genosuprimida codificada por el alelo *ind-a1-EMS06* (Tabla 3a).  
 10 Una proteína IND mutante parcialmente genosuprimida puede comprender una mutación de sustitución que da como resultado la sustitución de un resto de glicina (Gly) en la posición 146 de la proteína IND en SEC ID NO: 2, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de serina (Ser), tal como la proteína IND mutante parcialmente genosuprimida codificada por el alelo *ind-a1-EMS09* (Tabla 3a). Una proteína IND mutante parcialmente genosuprimida puede comprender una mutación de sustitución que da como resultado la sustitución de un resto de alanina (Ala) en la posición 159 de la proteína IND en SEC ID NO: 2, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de valina (Val), tal como la proteína IND mutante parcialmente genosuprimida codificada por el alelo *ind-a1-EMS13* (Tabla 3a). Una proteína IND mutante parcialmente genosuprimida puede comprender una mutación de sustitución que da como resultado la sustitución de un resto de treonina (Thr) en la posición 136 de la proteína IND en SEC ID NO: 4, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de metionina (Met), tal como la proteína IND mutante parcialmente genosuprimida codificada por el alelo *ind-c1-EMS08* (Tabla 3b). Una proteína IND mutante parcialmente genosuprimida puede comprender una mutación de sustitución que da como resultado la sustitución de un resto de alanina (Ala) en la posición 139 de la proteína IND en SEC ID NO: 4, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de treonina (Thr), tal como la proteína IND mutante parcialmente genosuprimida codificada por el alelo *ind-c1-EMS09* (Tabla 3b). Una proteína IND mutante parcialmente genosuprimida puede comprender una mutación de sustitución que da como resultado la sustitución de un resto de arginina (Arg) en la posición 142 de la proteína IND en SEC ID NO: 4, o una secuencia esencialmente similar a ella, en particular por un resto de cisteína (Cys), tal como la proteína IND mutante parcialmente genosuprimida codificada por el alelo *ind-c1-EMS04* (Tabla 3b).

30 Una proteína IND mutante parcialmente genosuprimida puede comprender una mutación de sustitución que da como resultado la sustitución de restos de aminoácidos conservados como se indica anteriormente o en la Tabla 1, tal como la proteína IND mutante parcialmente genosuprimida codificada por *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS04* o *ind-c1-EMS09* (indicados con \* en la Tabla 3).

#### Métodos

35 En otro aspecto, se describen métodos para generar y seleccionar plantas de semillas dehiscentes, y células, partes, semillas y progenie de las mismas, que contienen al menos un alelo *ind* parcialmente genosuprimido y/o al menos un alelo *ind* totalmente genosuprimido. En particular, se describen métodos para generar y seleccionar plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en particular plantas de *Brassica napus*, y células, partes, semillas y progenie de las mismas, que contienen al menos un alelo *ind* parcialmente genosuprimido y/o al menos un alelo *ind* totalmente genosuprimido en al menos uno de los al menos dos loci *IND* diferentes en el genoma, por ejemplo en al menos uno de los dos loci diferentes del gen *IND-A1* e *IND-C1* de *Brassica*, y para distinguir entre la presencia de alelos *ind* totalmente genosuprimidos, alelos *ind* parcialmente genosuprimidos y alelos *IND* de tipo salvaje en una planta de semilla dehiscente o parte de la planta. De este modo, se describen métodos (tales como selección por mutagénesis y/o asistida por marcadores) para generar y/o identificar alelos *ind* parcialmente genosuprimidos y/o alelos *ind* totalmente genosuprimidos, o plantas de semillas dehiscentes o partes de plantas que comprenden tales alelos *ind*, y para combinar un número adecuado de alelos *ind* parcialmente genosuprimidos y/o alelos *ind* totalmente genosuprimidos y/o tipos diferentes de alelos *ind* parcialmente genosuprimidos y/o alelos *ind* totalmente genosuprimidos en una única planta de semilla dehiscente para alterar las propiedades de dehiscencia del fruto de las plantas, en particular para reducir el desgranado de las semillas, o retrasar el desgranado de las semillas hasta después de la cosecha, mientras que se mantiene al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónicamente relevante de las vainas.  
 50

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

55 Tras la mutagénesis, las plantas se hacen crecer a partir de las semillas tratadas, o se regeneran a partir de las células tratadas usando técnicas conocidas. Por ejemplo, las semillas mutagenizadas se pueden sembrar según procedimientos de cultivo convencionales y, tras la autopolinización, se forma la semilla en las plantas. Como alternativa, se pueden extraer plántulas doblemente haploides a partir de células de microsporas o de polen tratadas para formar inmediatamente plantas homocigotas, por ejemplo, como describen Coventry et al. (1988, Manual for Microspore Culture Technique for *Brassica napus*. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Canadá). La semilla adicional que se forma como resultado de tal autopolinización en la presente o en una generación subsiguiente se puede cosechar e identificar en busca de la presencia de alelos *IND*  
 60

mutantes, usando técnicas que son convencionales en la técnica, por ejemplo, técnicas a base de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (amplificación de los alelos *ind*) o técnicas a base de hibridación, por ejemplo, análisis de transferencia Southern, identificación de genotecas BAC, y similares, y/o secuenciación directa de alelos *ind*. Para identificar la presencia de mutaciones de punto (denominadas polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs) en alelos *IND* mutantes, se pueden usar métodos de detección de SNP convencionales en la técnica, por ejemplo, técnicas basadas en oligoligación, técnicas basadas en extensión de una sola base, o técnicas basadas en diferencias en sitios de restricción, tales como TILLING.

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

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

Una vez que se ha secuenciado un alelo *IND* mutante específico, se pueden desarrollar cebadores y sondas que reconocen específicamente una secuencia con las regiones de flanqueo en 5’, de flanqueo 3’ y/o de mutación del alelo *IND* mutante en el ácido nucleico (ADN o ARN) de una muestra por medio de una técnica de biología molecular. Por ejemplo, se puede desarrollar un método de PCR para identificar el alelo *IND* mutante en muestras biológicas (tales como muestras de plantas, material vegetal o productos que comprenden material vegetal). Tal PCR se basa en al menos dos “cebadores” específicos: uno que reconoce una secuencia en la región de flanqueo en 5’ o en 3’ del alelo *IND* mutante y el otro que reconoce una secuencia en la región de flanqueo en 3’ o en 5’ del alelo *IND* mutante, respectivamente; o uno que reconoce una secuencia en la región de flanqueo en 5’ o 3’ del alelo *IND* mutante y el otro que reconoce una secuencia en la región de mutación del alelo *IND* mutante; o uno que reconoce una secuencia en una región de flanqueo en 5’ o en 3’ del alelo *IND* mutante y el otro que reconoce una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flanqueo en 3’ o en 5’ y la región de mutación del alelo *IND* mutante específico (como se describe adicionalmente más abajo), respectivamente.

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

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

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

- oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 200 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos seleccionada de la secuencia de la región de mutación de un alelo *IND* mutante específico o su complemento (es decir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos insertados o sustituidos en los genes *IND* de la invención o su complemento) (cebadores que reconocen secuencias de mutación).

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

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

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

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

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

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

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

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

Los protocolos de PCR estándar se describen en la técnica, tal como en "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2ª Edición, 1999) y otras referencias. Las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo la secuencia de los cebadores específicos, se especifica en un "protocolo de identificación de PCR" para cada alelo *IND* mutante específico. Sin embargo, se entiende que puede ser necesario ajustar un número de parámetros en el protocolo de identificación de PCR a las condiciones específicas de laboratorio, y se pueden modificar ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación de ADN puede requerir el ajuste de, por ejemplo, la cantidad de cebadores, polimerasa, concentración de  $MgCl_2$  o las condiciones de recombinación usadas. De forma similar, la selección de otros cebadores puede dictar otras condiciones óptimas

para el protocolo de identificación de PCR. Sin embargo, estos ajustes serán manifiestos para una persona experta en la técnica, y se detallan además en manuales actuales de aplicación de PCR tal como el citado anteriormente.

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

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

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

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

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

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

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

La detección y/o identificación de una "región específica *IND* mutante" que se hibrida a una sonda específica se puede producir de diversas maneras, por ejemplo, vía estimación del tamaño tras electroforesis en gel o vía métodos



de detección basados en fluorescencia. Otros métodos específicos de secuencias para la detección de una “región específica *IND* mutante” que se hibrida a una sonda específica son también conocidos en la técnica.

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

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

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

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

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

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

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

Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, se pueden diseñar dos cebadores que reconozcan específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje de tal manera que se dirijan uno hacia otro y que uno de ellos reconozca específicamente la región de unión entre la región de flanqueo en 5' o en 3' y la región de mutación. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente la secuencia de flanqueo en 5'

o en 3' y la región de unión entre la región de mutación y la región de flanqueo en 3' o en 5' del alelo *IND* de tipo salvaje, respectivamente. Este conjunto de cebadores, junto con un tercer cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región de mutación y la región de flanqueo en 3' o en 5' del alelo *IND* mutante, respectivamente, permite la amplificación mediante PCR de diagnóstico simultánea del gen *IND* mutante así como del gen *IND* de tipo salvaje.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La identificación de los productos de hibridación específicos *IND* de tipo salvaje y mutante se puede producir por ejemplo mediante estimación del tamaño tras electroforesis en gel o capilar (por ejemplo para alelos *IND* mutantes

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

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

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

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

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

El término "cebador", como se usa aquí, engloba cualquier ácido nucleico que sea 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 bicatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria. Las sondas se pueden usar como cebadores, pero se diseñan para unirse al ADN o ARN diana y no necesitan ser usadas en un proceso de amplificación.

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

El término "que se hibridan", como se usa aquí cuando se refiere a sondas específicas, se refiere al hecho de que la sonda se une a una región específica en la secuencia de ácido nucleico de un alelo *IND* mutante específico en condiciones de restricción estándar. "Condiciones" de restricción estándar, como se usa aquí, se refiere a las condiciones para la hibridación descritas aquí, o a las condiciones hibridantes convencionales como describen Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) que, por ejemplo, pueden comprender las siguientes etapas: 1) inmovilizar fragmentos de ADN genómico vegetal o ADN de genoteca BAC sobre un filtro, 2) prehibridar el filtro durante 1 a 2 horas a 65°C en 6 X SSC, 5 X

reactivo de Denhardt, 0,5% de SDS y 20 µg/ml de ADN portador desnaturalizado, 3) añadir la sonda de hibridación que se ha marcado, 4) incubar durante 16 a 24 horas, 5) lavar el filtro una vez durante 30 min. a 68°C en 6X SSC, 0,1% de SDS, 6) lavar el filtro tres veces (dos veces durante 30 min. en 30 ml y una vez durante 10 min. en 500 ml) a 68°C en 2 X SSC, 0,1% de SDS, y 7) exponer el filtro durante 4 a 48 horas a película de rayos X a -70°C.

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

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

También se describe un método para combinar un número adecuado de alelos *ind* parcialmente genosuprimidos y/o alelos *ind* totalmente genosuprimidos y/o tipos diferentes de alelos *ind* parcialmente genosuprimidos y/o alelos *ind* totalmente genosuprimidos en una única planta de semilla dehiscente para alterar las propiedades de dehiscencia del fruto de la planta, en particular para reducir el desgranado de las semillas, o retrasar el desgranado de la semilla hasta después de la cosecha, mientras se mantiene al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. Es adecuado para la invención un método para alterar las propiedades de dehiscencia del fruto, en particular para reducir el desgranado de las semillas, o retrasar el desgranado de las semillas hasta después de la cosecha, mientras se mantiene al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas, de una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, que comprende las etapas de:

- 30 - generar y/o seleccionar una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en la que al menos dos alelos de al menos dos genes *IND* son alelos *ind* parcialmente genosuprimidos, como se describe anteriormente,
- seleccionar una planta con propiedades alteradas de dehiscencia del fruto, en particular una planta en la que se reduce el desgranado de la semilla o se retrasa hasta después de la cosecha, mientras que las vainas mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante.

La planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND* puede ser una planta de *Brassica napus* que comprende un gen *IND-A1* y un gen *IND-C1*. Particularmente, los al menos dos alelos *ind* parcialmente genosuprimidos pueden ser alelos *ind* parcialmente genosuprimidos del gen *IND-C1*.

El método puede comprender además la etapa de generar y/o seleccionar una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en la que al menos dos alelos adicionales de al menos dos genes *IND* son alelos *ind* totalmente genosuprimidos, como se describe anteriormente. La planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND* puede ser una planta de *Brassica napus* que comprende un gen *IND-A1* y un gene *IND-C1*. Particularmente, los al menos dos alelos *ind* parcialmente genosuprimidos pueden ser alelos *ind* parcialmente genosuprimidos del gen *IND-A1*, y los al menos dos alelos *ind* totalmente genosuprimidos pueden ser alelos *ind* totalmente genosuprimidos del gen *IND-C1*.

Es adecuado para la invención un método para obtener una planta o semilla de cultivo de *Brassica* híbrida que comprende al menos dos genes *IND*, en particular una planta o semilla de *Brassica napus* híbrida, en el que las propiedades de dehiscencia del fruto de la planta o de la planta que se hace crecer a partir de la semilla están alteradas, en particular en el que se reduce el desgranado de las semillas o se retrasa hasta después de la cosecha, mientras que las vainas mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante, que comprende las etapas de:

- generar y/o identificar una primera planta que comprende un primer alelo *ind* parcialmente genosuprimido en estado homocigoto y una segunda planta que comprende un segundo alelo *ind* parcialmente genosuprimido en estado homocigoto, como se describe anteriormente,
- 55 - cruzar la planta primera y segunda y recoger semillas híbridas F1 del cruce que comprenden dos alelos *ind* parcialmente genosuprimidos de los al menos dos genes *IND*.

La primera planta puede comprender adicionalmente un primer alelo *ind* totalmente genosuprimido en estado

homocigoto y la segunda planta puede comprender adicionalmente un segundo alelo *ind* totalmente genosuprimido en estado homocigoto, como se describe anteriormente, y se recogen semillas híbridas F1 que comprenden dos alelos *ind* parcialmente genosuprimidos y dos alelos *ind* totalmente genosuprimidos de los al menos dos genes *IND*.

5 La posibilidad de usar plantas progenitoras que comprenden un alelo *ind* parcial y/o totalmente genosuprimido en estado homocigoto para producir semillas híbridas a partir de las cuales se pueden hacer crecer plantas que muestran un desgranado reducido o retrasado de las semillas, mientras que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas, proporciona una ventaja con respecto al uso de una planta progenitora que comprende dos alelos *ind* totalmente genosuprimidos en estado homocigoto y una planta progenitora que comprende un alelo *ind* totalmente genosuprimido en estado como se describe en el documento  
10 WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), ya que ambas plantas progenitoras producen vainas que muestran una capacidad de trilla agrónomicamente relevante, mientras que las vainas de la planta progenitora que comprende dos alelos *ind* totalmente genosuprimidos en estado homocigoto produce vainas similares a tubos a partir de las cuales es difícil cosechar las semillas.

15 Los alelos *ind* parcialmente genosuprimidos primero y segundo pueden ser los mismos, de manera que las semillas híbridas F1 son homocigotas para un alelo *ind* parcialmente genosuprimido. Los alelos *ind* totalmente genosuprimidos primero y segundo pueden ser los mismos, de manera que las semillas híbridas F1 son homocigotas para un alelo *ind* totalmente genosuprimido.

20 Los alelos *ind* totalmente genosuprimidos (es decir, alelos *IND* cuya expresión funcional está completamente abolida), tales como los descritos en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), y/o los alelos *ind* parcialmente genosuprimidos (es decir, alelos *IND* cuya expresión funcional está parcialmente abolida) como se describen aquí se pueden combinar según técnicas de reproducción estándar.

Los alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos se pueden combinar, por ejemplo, en una única planta de semilla dehiscente

25 (a) generando y/o identificando dos o más plantas que comprenden cada una uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados, como se describe anteriormente para los alelos *ind* parcialmente genosuprimidos y en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), para los alelos *ind* totalmente genosuprimidos,

30 (b) cruzando una primera planta que comprende uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados con una segunda planta que comprende uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados distintos, recogiendo semillas F1 del cruce, y, opcionalmente, identificando una planta F1 que comprende uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados de la primera planta con uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados de la segunda planta, como se describe anteriormente,

35 (c) opcionalmente, repitiendo la etapa (b) hasta que se obtiene una planta F1 que comprende todos los alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados,

(d) opcionalmente,

40 - identificando una planta F1, que es homocigota o heterocigota para un alelo *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionado determinando el estado de cigosidad de los alelos *IND* mutantes, como se describe anteriormente para los alelos *ind* parcialmente genosuprimidos y en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), para los alelos *ind* totalmente genosuprimidos, o

- generando plantas que son homocigotas para uno o más de los alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados llevando a cabo una de las siguientes etapas:

45 - extraer plantas doblemente haploides de células de microsporas o polen tratadas de plantas F1 que comprenden el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados, como se describe anteriormente,

50 - autofertilizar las plantas F1 que comprenden el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados durante una o más generaciones (*y*), recoger semillas F1 *Sy* de las autofertilizaciones, e identificar plantas F1 *Sy*, que son homocigotas para el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos, como se describe anteriormente.

Los alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos se pueden transferir, por ejemplo, desde una planta de semilla dehiscente a otra

- 5 (a) generando y/o identificando una primera planta que comprende uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados, como se describe anteriormente, o generando la primera planta combinando el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados en una planta, como se describe anteriormente (en el que la primera planta es homocigota o heterocigota para el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos)
- 10 (b) cruzando la primera planta que comprende el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos con una segunda planta que no comprende el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos, recoger semillas F1 del cruce (en el que las semillas son heterocigóticas para un alelo *ind* parcial y/o totalmente genosuprimido si la primera planta fue homocigota para ese alelo, y en el que la mitad de las semillas son heterocigóticas y la mitad de las semillas son acigóticas, es decir, no comprenden, un alelo si la primera planta fue heterocigota para ese alelo *ind* parcial y/o totalmente genosuprimido), y, opcionalmente, identificando plantas F1 que comprenden uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados, como se describe anteriormente,
- 15 (c) retrocruzando plantas F1 que comprenden uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados con la segunda planta que no comprende el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados para una o más generaciones (x), recoger semillas BCx de los cruces, e identificando en cada generación plantas BCx que comprenden el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados, como se describe anteriormente,
- 20 (d) opcionalmente, generando plantas BCx que son homocigotas para el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos seleccionados al llevar a cabo una de las siguientes etapas:
- extraer plantas doblemente haploides de células de microsporas o de polen tratadas de plantas BCx que comprenden el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos deseados, como se describe anteriormente,
  - autofertilizar las plantas BCx que comprenden el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos deseados durante una o más generaciones (y), recoger semillas BCx Sy de las autofertilizaciones, e identificar plantas BCx Sy, que son homocigotas para el uno o más alelos *ind* parcial y/o totalmente genosuprimidos deseados, como se describe anteriormente.
- 25

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

35

#### SECUENCIAS

- 40 SEC ID NO: 1: ADN codificante del gen *IND-A1* que codifica una proteína IND-A1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.
- SEC ID NO: 2: proteína IND-A1 de tipo salvaje codificada por SEC ID NO: 1.
- SEC ID NO: 3: ADN codificante del gen *IND-C1* que codifica una proteína IND-C1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.
- SEC ID NO: 4: proteína IND-C1 de tipo salvaje codificada por SEC ID NO: 3.
- 45 SEC ID NO: 5: ADN genómico del gen *IND-A1* que codifica una proteína IND-A1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.
- SEC ID NO: 6: proteína IND-A1 de tipo salvaje codificada por SEC ID NO: 5.
- SEC ID NO: 7: ADN genómico del gen *IND-C1* que codifica una proteína IND-C1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.
- SEC ID NO: 8: proteína IND-C1 de tipo salvaje codificada por SEC ID NO: 7.
- 50 SEC ID NO: 9: ADN codificante del gen *IND1* de *Arabidopsis*.
- SEC ID NO: 10: proteína IND1 de *Arabidopsis* codificada por SEC ID NO: 9.

SEC ID NO: 11:	Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS06 y -WT
SEC ID NO: 12:	Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS06
SEC ID NO: 13:	Oligonucleótido para la detección de IND-A1-WT
SEC ID NO: 14:	Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS09 y -WT
SEC ID NO: 15:	Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS09
SEC ID NO: 16:	Oligonucleótido para la detección de IND-A1-WT
SEC ID NO: 17:	Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS13 y -WT
SEC ID NO: 18:	Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS13
SEC ID NO: 19:	Oligonucleótido para la detección de IND-A1-WT
SEC ID NO: 20:	Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS04 y -WT
SEC ID NO: 21:	Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS04
SEC ID NO: 22:	Oligonucleótido para la detección de IND-C1-WT
SEC ID NO: 23:	Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS08 y -WT
SEC ID NO: 24:	Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS08
SEC ID NO: 25:	Oligonucleótido para la detección de IND-C1-WT
SEC ID NO: 26:	Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS09 y -WT
SEC ID NO: 27:	Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS09
SEC ID NO: 28:	Oligonucleótido para la detección de IND-C1-WT

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

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 – Generación y aislamiento de alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos (*ind*)

- 15 Las mutaciones en los genes *IND* representados en SEC ID NO: 1 o 3 y 5 o 7 del listado de secuencias se generaron e identificaron según lo siguiente:
- Se preempaparon durante dos horas 30.000 semillas procedentes de la línea de reproducción de colza de primavera élite (semillas M0) sobre papel de filtro húmedo en agua desionizada o destilada. La mitad de las semillas se expuso a 0,8% de EMS y la mitad a 1% de EMS (Sigma: M0880), y se incubó durante 4 horas.
  - 20 - Las semillas mutagenizadas (semillas M1) se enjuagaron 3 veces y se secaron en una campana extractora de humos toda la noche. 30.000 plantas M1 se hicieron crecer en suelo y se autofertilizaron para generar semillas M2. Las semillas M2 se cosecharon para cada planta M1 individual.
  - Se hicieron crecer dos veces 4800 plantas M2, derivadas de diferentes plantas M1, y se prepararon muestras de ADN de muestras de hojas de cada planta M2 individual según el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1987, Phytochemistry Bulletin 19:11-15).
  - 25 - Las muestras de ADN se examinaron en busca de la presencia de mutaciones de punto en los genes *IND* provocando la sustitución de aminoácidos en las proteínas IND, particularmente en el dominio de bHLH de las

proteínas IND, mediante secuenciación directa mediante técnicas de secuenciación estándar (Agowa) y analizando las secuencias en busca de la presencia de las mutaciones de punto usando el software NovoSNP (VIB Antwerp).

- 5 - De este modo se identificaron los siguientes alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos (*ind*) indicados en la Tabla 3a y 3b anteriores:

En conclusión, los ejemplos anteriores muestran cómo se pueden generar y aislar alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos. También, el material vegetal que comprende tales alelos mutantes se puede usar para combinar alelos *IND* mutantes seleccionados en una planta, como se describe en los siguientes ejemplos.

10 **Ejemplo 2 – Identificación de una planta de *Brassica* que comprende un alelo *IND* de *Brassica* mutante parcialmente genosuprimido**

Plantas de *Brassica* que comprenden las mutaciones en los genes *IND* identificados en el Ejemplo 1 se identificaron según lo siguiente:

- 15 - Para cada gen *IND* mutante identificado en la muestra de ADN de una planta M2, se hicieron crecer al menos 50 plantas M2 derivadas de la misma planta M1 que la planta M2 que comprende la mutación *IND*, y se prepararon muestras de ADN a partir de muestras de hojas de cada planta M2 individual.
- Las muestras de ADN se examinaron en busca de la presencia de la mutación *IND* de punto identificada como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.
- Plantas M2 heterocigóticas y homocigotas (según se determina en base a los electroferogramas) que comprenden la misma mutación se autofertilizaron, y se cosecharon semillas M3.

20 **Ejemplo 3 – Análisis de las propiedades de dehiscencia del fruto de plantas de *Brassica* que comprenden un gen *IND* de *Brassica* mutante parcial y/o totalmente genosuprimido**

25 Para determinar la correlación entre la presencia de genes *IND* mutantes parcial y/o totalmente genosuprimidos en plantas de *Brassica* y las propiedades de dehiscencia del fruto de las plantas de *Brassica*, se analizaron en el invernadero y en el campo las propiedades de dehiscencia del fruto de plantas de *Brassica napus* que comprenden un gen *IND* mutante parcialmente genosuprimido en un estado homocigoto solo o un gen *IND* mutante tanto parcial como totalmente genosuprimido en estado homocigoto, y se compararon con las propiedades de dehiscencia del fruto de plantas de *Brassica napus* que comprenden 2 a 4 alelos *ind* totalmente genosuprimidos como se describen en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052) como sigue:

- 30 - Para examinar si y cómo los márgenes de valvas de fruto y las propiedades de dehiscencia de vainas de semillas se vieron afectados por la presencia de genes *IND* mutantes parcial y/o totalmente genosuprimidos, el fruto *ind* se comparó con el fruto de tipo salvaje usando los siguientes ensayos macroscópicos:

35 (a) Inspección de las vainas de semillas y plantas en general a simple vista para determinar diferencias en el fenotipo de las vainas y plantas provocadas por la presencia de genes *IND* mutantes parcial y/o totalmente genosuprimidos diferentes. Determinación del fenotipo de las vainas: cuando las vainas se hicieron crecer totalmente y estuvieron llenas, justo antes del amarillamiento, se evaluó el grado de agudeza de la zona que delinea la valva y el pico en la zona en la que ambas valvas ya no se tocan más (en el extremo distal de la vaina) de 5 vainas aleatorias (procedentes de diferentes plantas si existen múltiples plantas por línea), y se le atribuyó una puntuación de 0 a 10 o de 1 a 5: 0 o 1, respectivamente, para una indentación clara y una zona afilada fina que separa la valva y el pico; 1-3 o 2, respectivamente, para cierta indentación y una zona clara, aunque más borrosa, que separa la valva del pico; 4-6 o 3, respectivamente, para valvas y pico que todavía son bien observables como dos tejidos diferentes pero con una transición muy suave entre ellos; 7-9 o 4, respectivamente, para valvas y pico que apenas son observables como tejidos diferentes; 10 o 5, respectivamente, para una transición completamente suave entre valvas y pico sin ninguna diferenciación clara entre ambos tipos de tejidos, es decir, cuanto menos indentación entre la valva y el pico en el extremo distal de las vainas mayor es la puntuación. Una puntuación de 0 o 1, respectivamente, (indentación notable entre la valva y el pico) corresponde a un fenotipo de tipo salvaje de las vainas, más específicamente un fenotipo de las vainas sensible al desgranado de las vainas; una puntuación de 1 a 9 o 2 a 4, respectivamente, (transición más gradual entre la valva y el pico) corresponde a un fenotipo de las vainas resistente al desgranado de las vainas, en el que el desgranado de las semillas está significativamente reducido o retrasado mientras se mantiene una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas, de manera que las vainas todavía se pueden abrir a lo largo de la zona de dehiscencia aplicando fuerzas físicas limitadas; y una puntuación de 10 o 5, respectivamente, (sin indentación entre la valva y el pico) corresponde a un fenotipo de las vainas resistente al desgranado de las vainas, en el que el desgranado de las semillas está reducido o retrasado hasta un grado que ya no permite una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las



vainas, de manera que las vainas no se pueden abrir a lo largo de la zona de dehiscencia aplicando fuerzas físicas limitadas.

(b) Ensayo de impacto manual (MIT) para determinar el incremento en la resistencia al desgranado de las vainas provocado por la presencia de genes *IND* mutantes parcial y/o totalmente genosuprimidos diferentes: el nivel de resistencia al desgranado de las vainas de líneas de *Brassica napus* que comprenden un gen *ind* mutante parcialmente genosuprimido en estado homocigoto solo o un gen *IND* mutante tanto parcial como totalmente genosuprimido en estado homocigoto y de líneas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* de tipo salvaje se comparó de una forma semicuantitativa determinando las fuerzas físicas necesarias para abrir vainas maduras cerradas aplicando manualmente torsión a las vainas. A la resistencia de las vainas al desgranado de las vainas se le atribuyó una puntuación de 1 a 5 en base a esta fuerza física: 1 para vainas que se abren completamente a lo largo de la zona de dehiscencia a la torsión más pequeña, 2-4 para vainas que se abren solamente en la base de la zona de dehiscencia y necesitan una mayor torsión para abrirse completamente, y 5 para vainas que solo se pueden triturar y no se abren a lo largo de la zona de dehiscencia.

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

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

- Para examinar más de cerca si y cómo las células en el margen de la valva de vainas de semillas se ven afectadas por la presencia de genes *IND* mutantes parcial y/o totalmente genosuprimidos, se compararon

secciones de fruto *ind* con secciones de fruto de tipo salvaje mediante evaluación microscópica de las vainas de semillas:

- 5 - Explantes: Explantes de alrededor de 3 mm tomados del centro y de los extremos distales de vainas de etapa de desarrollo (alrededor de 35 días después de la antesis (DAA), una etapa de desarrollo que corresponde estrechamente al comienzo del amarillamiento del pericarpio visible) y tamaño similares se cosecharon de plantas que se hicieron crecer en un invernadero (tres vainas por cada genotipo). Una zona de dehiscencia se disecó de las vainas.
- 10 - Fijación: La fijación se realizó en 100 mM de tampón de fosfato de potasio pH 7 con 10% de formalina y 0,25% de glutaraldehído durante un total de 4 horas. La infiltración a vacío se realizó después de 1 y 2 horas durante 15 minutos. El fijador se renovó después de cada infiltración a vacío.
- 15 - Deshidratación: La muestra se enjuagó 2 veces 30 minutos con 100 mM de tampón de fosfato de potasio pH 7. La deshidratación se realizó con etanol técnico diluido con 0,85% de NaCl en agua: 60 minutos (') en 50% de etanol, 90' en 70% de etanol, 90' en 80% etanol, 90' en 90% de etanol, 90' en 95% de etanol, 90' en 100% de etanol a temperatura ambiente.
- 20 - Empapamiento: El empapamiento se realizó con los kits de empapamiento Leica 7022-31731 Historesin o el Kulzer Histo-Technik 7100 (Heraeus), que son kits de resinas de tres componentes (una resina básica, un activador y un endurecedor). Los tres componentes se usaron en las proporciones como se aconseja por el fabricante según lo siguiente: la muestra se incubó durante 4 horas en 50% de etanol/50% de resina básica, toda la noche en 30% de etanol/70% de resina básica (opcional: a 4°C), durante 2 a 4 horas en 100% de resina básica, durante un día en 100% de resina básica después de renovar la resina básica y filtrar a vacío durante 20' (opcionalmente a 4°C), durante un día en resina básica + activador (1%) ("medio de infiltración") tras la infiltración a vacío en este medio durante 20 minutos. La muestra se lavó con resina básica + activador (1%) + endurecedor (1 ml en 15 ml) ("medio de empapamiento"). El empapamiento se realizó en moldes de empapamiento planos (moldes de empapamiento planos de AGAR G3531 con cavidades de alrededor de 300 µl: 14 mm de longitud x 6 mm de anchura x 4 mm de profundidad): se añadieron 100-125 µl de medio de empapamiento/cavidad, el medio de empapamiento se polimerizó a 55°C durante alrededor de una hora, el tejido se colocó en el medio de empapamiento polimerizado (1 explante/cavidad), las cavidades se rellenaron con medio de empapamiento, el medio de empapamiento se polimerizó durante 3 a 5 horas a 55°C, los moldes se enfriaron, los bloques de plástico se retiraron de los moldes y se almacenaron a temperatura ambiente en un recipiente cerrado herméticamente (por ejemplo, tubo eppendorf).
- 25 - Corte en secciones: Los bloques de plástico se pegaron con pegamento con el lado plano sobre un bloque de perspex de 1 cm<sup>3</sup> y se recortaron de forma cuadrada alrededor de la muestra. Se cortaron secciones de 4 µm (3 a 4 explantes por genotipo, alrededor de 25 secciones por explante) con un cuchillo de vidrio ralph (realizado en la posición -1 del cuchillo de Reichert-Jung usando varillas de vidrio de 6 mm de grosor bajo un ángulo de corte de alrededor de 6°) en el microtomo. Las secciones se unieron sobre portaobjetos de vidrio tratados con Vectabond (Vector laboratories).
- 30 - Demostración de lignina: Secciones no teñidas montadas en Eukitt se examinaron usando un microscopio equipado para fluorescencia (con ajuste de filtro 02 de Zeiss). La lignina fluoresce de color azulado claro.
- 35 - Evaluación de histología: Secciones sin teñir se visualizaron usando DIC-Normaski o autofluorescencia (con ajuste del filtro 18 de Zeiss – excitación BP390-420; emisión LP450).
- 40 - Evaluación de histología: Secciones sin teñir se visualizaron usando DIC-Normaski o autofluorescencia (con ajuste del filtro 18 de Zeiss – excitación BP390-420; emisión LP450).
- 45 - Evaluación de histología: Secciones sin teñir se visualizaron usando DIC-Normaski o autofluorescencia (con ajuste del filtro 18 de Zeiss – excitación BP390-420; emisión LP450).

#### Material vegetal:

Progenie de una línea vegetal que comprende una mutación totalmente genosuprimida en el gen *IND-A1* (indicada como *ind-a1<sup>F</sup>*), en particular el alelo *ind-a1-EMS01* descrito en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052) (indicado como *ind-a1-01* en la Tabla 5), y una mutación parcialmente genosuprimida en el gen *IND-C1* (indicado como *ind-c1<sup>P</sup>*), en particular los alelos *ind-c1-EMS04*, -*EMS08* y -*EMS09* indicados en la Tabla 3b (indicados como *ind-c1-04*, -*08*, y -*09* en la Tabla 5), con genotipo *ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>*, *ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>* (es decir, plantas mutantes dobles homocigotas), *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>P</sup>* (es decir, plantas mutantes individuales homocigotas), e *IND-A1/IND-A1*, *IND-C1/IND-C1* (es decir, plantas de tipo salvaje).

Progenie de una línea vegetal que comprende una mutación parcialmente genosuprimida en el gen *IND-A1* (indicado como *ind-a1<sup>P</sup>*), en particular los alelos *ind-a1-EMS06*, -*EMS09* y -*EMS13* indicados en la Tabla 3a (indicados como

5 *ind-a1-06*, *-09*, y *-13* en la Tabla 5), y una mutación totalmente genosuprimida en el gen *IND-C1* (indicado como *ind-c1<sup>F</sup>*), en particular el alelo *ind-c1-EMS01* y el alelo *ind-c1-EMS03* descritos en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052) (indicados como *ind-c1-01* y *-03* en la Tabla 5), con genotipo *ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>*, *ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>* (es decir, plantas mutantes dobles homocigotas), *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>* (es decir, plantas mutantes individuales homocigotas), e *IND-A1/IND-A1*, *IND-C1/IND-C1* (es decir, plantas de tipo salvaje).

Evaluación macroscópica:

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

10 - Las vainas de plantas hermanas *IND* mutantes homocigotas dobles con genotipo *ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>*, *ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>* o *ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>*, *ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>* mostraron un fenotipo similar a las vainas de plantas que comprenden un alelo *ind* totalmente genosuprimido en estado homocigoto y un alelo *ind* totalmente genosuprimido en estado heterocigoto descrito en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052) (genotipo: *ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>* *IND-C1/ind-c1<sup>F</sup>* o *IND-A1/ind-a1<sup>F</sup>*, *ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>*, en el que *ind-a1<sup>F</sup>* es un alelo *ind-a1* totalmente genosuprimido, en particular el alelo *ind-a1-EMS01* o *ind-a1-EMS05* descrito en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052) y en el que *ind-c1<sup>F</sup>* es un alelo *ind-c1* totalmente genosuprimido, en particular el alelo *ind-c1-EMS01* o *ind-c1-EMS03* descrito en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052). Más específicamente, los márgenes de la valva de las vainas de estas plantas hermanas *IND* mutantes estaban en general mejor definidas que en las plantas hermanas *IND* mutantes totalmente genosuprimidas dobles homocigotas descritas en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052) (que mostraron una falta de definición apropiada del margen de la valva, particularmente manifiesto tanto en el extremo proximal como en el distal del fruto, en comparación con las vainas de plantas hermanas *IND* de tipo salvaje), pero la profunda indentación entre la valva y el pico en el extremo distal de las vainas en las plantas hermanas de tipo salvaje estaba todavía en gran medida ausente en estas plantas mutantes como en las plantas hermanas *ind* totalmente genosuprimidas dobles homocigotas, que también mostraron una transición más gradual entre la valva y el tejido del pico (véase también el núcleo visual en la Tabla 5a para plantas que se hicieron crecer en invernadero, y en la Tabla 5b para plantas que se hicieron crecer en el campo).

30 - Las vainas de plantas hermanas *IND* mutantes individuales homocigotas (genotipo: *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>* o *ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>*, *IND-C1/IND-C1*) mostraron una morfología de las vainas similar a las vainas de plantas hermanas *IND* de tipo salvaje, excepto para vainas procedentes de plantas hermanas *IND* mutantes individuales homocigotas con genotipo *IND-A1-EMS01/IND-A1-EMS01*, *ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09*, que mostraron una morfología de las vainas alterada similar a las vainas procedente de las plantas hermanas *IND* mutantes dobles homocigotas con genotipo *ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>*, *ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>* o *ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>*, *ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>* (véase también el núcleo visual en la Tabla 5a para plantas que se hicieron crecer en invernadero, y en la Tabla 5b para las plantas que se hicieron crecer en el campo). Se observó además que la presencia del alelo *ind-c1-EMS09* en estado heterocigoto en plantas (genotipo: *IND-A1/IND-A1*, *IND-C1/ind-c1-EMS09*) fue suficiente para provocar una morfología alterada de las vainas similar a las vainas procedentes de las plantas hermanas *IND* mutantes dobles homocigotas con genotipo *ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>*, *ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>* o *ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>*, *ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>*. Se piensa que el alelo *ind-c1-EMS09*, que comprende una mutación de sustitución en un aminoácido conservado del dominio de unión a ADN básico, puede producir una proteína *IND* negativa dominante que todavía es capaz de formar dímeros, pero no es capaz de unirse al sitio de unión de bHLH del gen o genes regulados.

b) Ensayo de impactos aleatorios:

45 - La Tabla 5 muestra que el valor LD50 fue en general mayor para vainas procedentes de plantas que comprenden un alelo *ind-c1* totalmente genosuprimido en estado homocigótico y un alelo *ind-a1* parcialmente genosuprimido en estado homocigótico que para vainas procedentes de plantas que comprenden un alelo *ind-a1* totalmente genosuprimido en estado homocigótico y un alelo *ind-c1* parcialmente genosuprimido en estado homocigótico, indicando que las mutaciones en el alelo *IND-C1* podrían tener un efecto más potente sobre la resistencia al desgranado de las vainas que las mutaciones en el alelo *IND-A1*.

Tabla 5a

Genotipo	Puntuación visual de la vaina (0-10)	LD50 (s)	95% inferior corregido	95% superior corregido
<i>IND-A1-06/IND-A1-06</i> , <i>IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	8,06	3,1	1,78
<i>ind-a1-06/ind-a1-06</i> , <i>IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	9,05	2,83	2,15

ES 2 604 317 T3

Genotipo	Puntuación visual de la vaina (0-10)	LD50 (s)	95% inferior corregido	95% superior corregido
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	7	26,31	4,83	7,64
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8,86	*	*
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	5,74	4,2	2,06
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	7	29,38	3,8	5,18
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	9,36	2,6	1,7
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	9,05	2,83	2,15
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8	52,03	8,96	14,03
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8,44	2,74	2,26
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	9,05	2,83	2,15
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8,5	85,57	23,34	64,64
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	3	12,91	2,4	2,46
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	2	14,2	2,2	2,59
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	7	61,21	9,6	15,18
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8,86	*	*
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	7,74	3,98	1,54
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	9	56,68	8,9	13,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	0	7,89	2,88	2
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	0	10,91	2,5	2
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	9	37,8	5,77	8,4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	0	8,94	2,78	2,38
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	0	9,8	2,8	2,1
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8,5	31,81	6,66	10,45

ES 2 604 317 T3

Genotipo	Puntuación visual de la vaina (0-10)	LD50 (s)	95% inferior corregido	95% superior corregido
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	0	7,22	3,56	1,82
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	8,5	46,6	7,82	11,48
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	9	90,11	*	*

Tabla 5b

Genotipo	Puntuación visual de la vaina (1-5)	Puntuación basada en la fuerza física necesaria para abrir vainas maduras cerradas (1-5)	LD50 (s)	
			campo 1	campo 2
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	9,7	7,2
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	6,2	8,3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	2	2	17,0	16,6
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	6,5	6,6
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	7,4	5,3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	2	15,3	12,4
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	7,5	6,9
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	5,4	7,2
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	3	4	60,1	77,0
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	6,6	6,2
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	7,7	7,0
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	4	49,8	63,0
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	11,7	10,7
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	10,7	7,9
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	3	3	19,1	22,9
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	5,4	5,7
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	9,2	8,3

ES 2 604 317 T3

Genotipo	Puntuación visual de la vaina (1-5)	Puntuación basada en la fuerza física necesaria para abrir vainas maduras	LD50 (s)	
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	3	10,2	38,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	1	1	6,5	7,4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	1	2	9,5	7,2
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	3	5	87,7	126,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	1	1	9,7	8,3
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	1	1	4,9	9,0
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	3	3	14,9	23,7
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	1	1	9,1	8,3
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	3	2	7,9	8,3
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	5	5	*	*
* : incontable				

c) Ensayos de campo

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

5

Tabla 5c

Genotipo	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (en gramos/parcela)	Yield WTSeg %	YLDS (en % en peso de paja)
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,3	5,0	5,0	2263,3	100	0,4
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,4	4,6	5,0	2274,9	101	0,3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8,7	4,4	4,9	2525,1	112	1,1
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,6	4,6	4,9	2102,0	100	0,5
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,7	4,8	5,0	2292,7	109	0,4
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8,8	4,1	4,6	2276,2	108	1,3
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,3	5,0	4,9	1964,2	100	0,3

ES 2 604 317 T3

Genotipo	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (en gramos/parcela)	Yield WTSeg %	YLDS (en % en peso de paja)
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,0	4,7	5,0	1872,0	95	0,4
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	9,0	2,7	3,8	2323,3	118	5,7
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,6	4,8	5,0	2168,9	100	0,5
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,3	4,7	5,0	1985,6	92	0,4
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	9,0	1,9	3,6	1726,7	80	13,6
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,3	4,8	5,0	1977,1	100	0,4
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,4	4,2	4,9	1929,3	98	0,5
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8,9	3,6	4,7	2445,6	124	2,0
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,3	4,2	5,0	1885,1	100	0,4
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,3	4,8	5,0	2137,8	113	0,6
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8,9	2,8	3,9	2120,9	113	4,8
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	8,8	4,9	4,8	2120,4	100	0,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	8,6	4,8	5,0	2136,4	101	0,6
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	9,0	1,8	2,8	1437,0	68	19,1
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	8,0	4,8	5,0	2250,4	100	0,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8,3	4,3	4,9	2131,3	95	0,5
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8,9	3,0	4,1	2385,1	106	2,5
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	8,7	4,9	5,0	2080,0	100	0,4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	8,7	4,6	4,6	2447,8	118	1,0
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	9,0	1,1	1,8	589,6	28	28,4

Evaluación microscópica

- Las vainas procedentes de plantas hermanas *IND* mutantes dobles homocigotas con genotipo *ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>* o *ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>* y las vainas procedentes de plantas hermanas *IND*

mutantes individuales homocigotas con genotipo *IND-A1-EMS01/IND-A1-EMS01*, *ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09*, que se hicieron crecer en condiciones de invernadero, mostraron en sus extremos distales lignificación a lo largo de toda la zona de dehiscencia y una mala diferenciación de las células que pertenecen a la zona de dehiscencia de tipos de células vecinas, tales como las células de tejidos vasculares y la capa lignificada de células encontrada normalmente en la pared interna de las vainas (es decir, las células *enb*). En el centro de las vainas, la lignificación no se produjo a lo largo de toda la zona de dehiscencia, sino que en su lugar las vainas presentaron solamente unas pocas capas extras de células lignificadas donde la pared interna de las vainas se une al tabique.

- Las vainas de plantas hermanas *IND* mutantes dobles homocigotas con genotipo *ind-a1-EMS01/ind-a1-EMS01*, *ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09* mostraron tanto en sus extremos distales como en el centro de las vainas una lignificación a lo largo de toda la zona de dehiscencia y una mala diferenciación de las células que pertenecen a la zona de dehiscencia de los tipos celulares vecinos, tales como las células del tejido vascular y la capa lignificada de células que se encuentra normalmente en la pared interior de las vainas (es decir, las células *enb*).

#### 15 Ejemplo 4 – Detección y/o transferencia de genes *IND* mutantes en líneas de *Brassica* (élite)

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

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

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

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

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

El retrocruzamiento se repite hasta BC3 a BC6

Plantas BC3-6: 50% *IND/ind* y 50% *IND/IND*

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

Cruce BC3-6 S1: *IND / ind* X *IND / ind*  
 Plantas BC3-6 S1: 25% *IND / IND* y 50% *IND / ind* y 25% *ind / ind*

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

Para seleccionar plantas que comprenden una mutación de punto en un alelo *IND*, se puede usar la secuenciación directa mediante técnicas de secuenciación estándar conocidas en la técnica, tales como las descritas en el Ejemplo 1.

- 35 Como alternativa, se pueden desarrollar ensayos de PCR para discriminar plantas que comprenden una mutación de punto específica en un alelo *IND* de plantas que no comprenden esa mutación de punto específica. De este modo, se pueden desarrollar los siguientes ensayos de PCR discriminantes para detectar la presencia o ausencia y el estado de cigosidad de los alelos mutantes identificados en el Ejemplo 1 (véase la Tabla 3a y 3b):

- ADN molde:



## ES 2 604 317 T3

- ADN genómico aislado de material de hoja de plantas de *Brassica* mutantes homocigotas o heterocigóticas (que comprenden un alelo *IND* mutante, denominado en lo sucesivo "IND-Xx-EMSXX").
- 5 - Control de ADN de tipo salvaje: ADN genómico aislado de material de hoja de plantas de *Brassica* de tipo salvaje (que comprenden el equivalente de tipo salvaje del alelo *IND* mutante, denominado en lo sucesivo "IND-Xx-WT").
- Control de ADN positivo: ADN genómico aislado de material de hoja de plantas de *Brassica* mutantes homocigotas que se sabe que comprenden IND-Xx-EMSXX.
- 10 - Generalmente, cada conjunto de cebadores consiste en un cebador específico tanto para el gen diana mutante como el de tipo salvaje (por ejemplo, el cebador específico para tanto el alelo IND-A1-EMS06 como IND-A1-WT), y un cebador específico para la diferencia nucleotídica (por ejemplo, el cebador específico para el alelo IND-A1-EMS06 o el alelo IND-A1-WT). Habitualmente, el último nucleótido del último cebador coincide con la diferencia nucleotídica, pero se puede añadir un (o más) nucleótido (o nucleótidos) específicos diana adicionales para mejorar la recombinación entre el cebador y su secuencia diana.
- 15 - Mezcla de PCR: 2,5 µl de tampón de PCR 10x (15 mM de MgCl<sub>2</sub>), 0,25 µl de dNTP's (20 mM), 1 µl de cebador directo (10 µM), 1 µl de cebador inverso (10 µM), 0,25 µl de Taq-polimerasa (5 U/µl), 19,5 µl de Milli-Q H<sub>2</sub>O, 0,5 µl de ADN (20-50 ng/µl) = volumen total de 25 µl;
- Perfil de termociclaje: 4 min. a 95°C; 30 x [1 min. a 95°C (desnaturalización) y 1 min. a la temperatura de hibridación y 2 min. a 72°C (alargamiento)]; 5 min. a 72°C; enfriar hasta 4°C. La temperatura de hibridación óptima se puede determinar mediante PCR de gradiente de temperatura, en la que la temperatura de hibridación se puede variar por ejemplo entre 57°C a 70°C en un termociclador MJ Research PTC-200 (Biozym). La temperatura de hibridación óptima para los cebadores específicos *IND* de tipo salvaje es aquella temperatura a la que se puede detectar (como se describe más abajo) un fragmento claro de PCR del tamaño esperado para la muestra de ADN procedente de la planta de *Brassica* de tipo salvaje y no para la muestra de ADN procedente de la planta de *Brassica* mutante. La temperatura de hibridación óptima para los cebadores específicos *IND* mutantes es aquella temperatura a la que se puede detectar (como se describe más abajo) un fragmento claro de PCR del tamaño esperado para la muestra de ADN procedente de la planta de *Brassica* mutante y no para la muestra de ADN procedente de la planta de *Brassica* de tipo salvaje.
- 20 - Tras la amplificación, se añaden 5 µl de colorante de carga (colorante naranja) a 15 µl de las muestras de PCR, y las muestras se cargan en un gel de agarosa al 1,5%.
- 25 - Los patrones de las bandas obtenidos tras la amplificación de ADN genómico de plantas de *Brassica* mutantes se evaluaron según lo siguiente:
  - Los datos de muestras de ADN aisladas de material de hoja de las plantas de *Brassica* mutantes en un experimento individual de PCR y una sola mezcla de PCR no se deberían de aceptar excepto que:
    - 35 - el control de ADN de tipo salvaje muestre el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT*, y no el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX*
    - 40 - el control de ADN positivo muestre el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX*, y no el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT*
  - Las líneas que no muestran ningún producto de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT* y el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX* indican que la planta correspondiente a partir de la que se preparó el ADN molde genómico es un mutante homocigótico para *IND-Xx-EMSXX*.
  - 45 - Las líneas que muestran el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT* y el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX* indican que la planta correspondiente a partir de la que se preparó el ADN molde genómico es un mutante heterocigótico para *IND-Xx-EMSXX*.
  - 50 - Las líneas que muestran el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT* y ningún producto de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX* indican que la planta correspondiente a partir de la que se preparó el ADN molde genómico es una planta de tipo salvaje.

Como alternativa, se puede usar la tecnología Invader™ (Third Wave Agbio) para discriminar plantas que comprenden una mutación de punto específica en un alelo *IND* de plantas que no comprenden esa mutación de

punto específica. De este modo, se desarrollaron las siguientes sondas Invader™ discriminantes para detectar la presencia o ausencia y el estado de cigosidad de los alelos mutantes identificados en el Ejemplo 4 (véase la Tabla 6:

- En la Tabla 6 se indican sondas específicas para el gen *IND* diana mutante o de tipo salvaje correspondiente (indicado como “5’ flap1-x” y “5’ flap2-x”, respectivamente) y sondas “invasoras” que se pueden usar en combinación con ellas. Generalmente, cada conjunto de sondas consiste en una sonda específica para el gen diana mutante o el de tipo salvaje del cual el primer nucleótido tras la secuencia de aleta en 5’ coincide con la diferencia nucleotídica (nucleótido subrayado en la Tabla 6) (la denominada “sonda primaria”; por ejemplo, la sonda con SEC ID NO: 12 es específica para IND-A1-EMS06 y la sonda con SEC ID NO: 13 es específica para IND-A1-WT), y una sonda específica para los nucleótidos en dirección 5’ de la diferencia nucleotídica (el denominado “oligo invader®”; por ejemplo, la sonda con SEC ID NO: 11 es específica para los nucleótidos en dirección 5’ de la diferencia nucleotídica entre IND-A1-EMS06 e IND-A1-WT). El último nucleótido del último cebador puede coincidir con la diferencia nucleotídica en el mutante (como se indica mediante los nucleótidos en negrita en la Tabla 6), pero igualmente se pueden usar otros nucleótidos para este último nucleótido en tanto que la sonda primaria y el oligo invader® sean todavía capaces de formar un solapamiento de una sola base cuando se hibridan al ADN diana para generar la estructura invasiva específica reconocida por las enzimas Cleavase® (Third Wave Agbio).
- El procedimiento de ensayo Invader™ y la interpretación de los datos se llevan a cabo como se prescribe por el fabricante (Third Wave Agbio). De forma breve, las secuencias nucleotídicas indicadas como “flap1” y “flap2” en la Tabla 6 representan las secuencias de las “aletas” en 5’ que se escinden de las sondas primarias en la fase primaria del ensayo Invader™ y que son complementarias a las secuencias en el casete 1 y 2 FRET™, respectivamente, y no complementarias a las secuencias mutantes o de tipo salvaje diana. Si las sondas primarias se escinden en la fase primaria y la sonda flap1 y/o la sonda flap2 se hibrida al casete 1 y 2 de FRET™, respectivamente, en la fase secundaria, se genera una señal indicativa de la presencia del gen *IND* diana mutante o de tipo salvaje correspondiente en la muestra, respectivamente.

Tabla 6

Alelo nº	Sondas	
IND-A1-EMS06	5' CGTAAGGGTAAGCGACGACCCCTCAGACGT 3'	(SEC ID NO: 11)
	5' flap1- <u>A</u> TGGTGGCTCGTCG 3'	(SEC ID NO: 12)
IND-A1-WT	5' CGTAAGGGTAAGCGACGACCCCTCAGACGT 3'	(SEC ID NO: 11)
	5' flap2-GTGGTGGCTCGTC 3'	(SEC ID NO: 13)
IND-A1-EMS09	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(SEC ID NO: 14)
	5' flap1- <u>I</u> TGGCACCATCCTCT 3'	(SEC ID NO: 15)
IND-A1-WT	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(SEC ID NO: 14)
	5' flap2- <u>C</u> TGGCACCATCCTCT 3'	(SEC ID NO: 16)
IND-A1-EMS13	5' CCTGCCGTTTCAAGAACTTGGTGTAGCGGATGT 3'	(SEC ID NO: 17)
	5' flap1- <u>A</u> CTTCGTGCGAGCATG 3'	(SEC ID NO: 18)
IND-A1-WT	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(SEC ID NO: 17)
	5' flap2-GCTTCGTGCGAGCATG 3'	(SEC ID NO: 19)
IND-C1-EMS04	5' CATCCTCTTCAATATCCGGATCTTCTCGCTTATCC TTTCTCTACT 3'	(SEC ID NO: 20)
	5' flap1- <u>A</u> CCGACGAGCCAC 3'	(SEC ID NO: 21)
IND-C1-WT	5' CATCCTCTTCAATATCCGGATCTTCTCGCTTATCC TTTCTCTACT 3'	(SEC ID NO: 20)
	5' flap2-GCCGACGAGCCAC 3'	(SEC ID NO: 22)
IND-C1-EMS08	5' CGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCCAGA 3'	(SEC ID NO: 23)
	5' flap1- <u>I</u> GGTGGTGGCTCG 3'	(SEC ID NO: 24)

# ES 2 604 317 T3

IND-C1-WT	5' CGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCCAGA 3'	(SEC ID NO: 23)
	5' flap2- <u>C</u> GGTGGTGGCTCG 3'	(SEC ID NO: 25)
IND-C1-EMS09	5' CGAGGACCCCCAGACGGTGGTGT 3'	(SEC ID NO: 26)
	5' flap1- <u>A</u> CTCGTCGGCGTAG 3'	(SEC ID NO: 27)
IND-C1-WT	5' CGAGGACCCCCAGACGGTGGTGT 3'	(SEC ID NO: 26)
	5' flap2- <u>G</u> CTCGTCGGCGT 3'	(SEC ID NO: 28)

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una planta de *Brassica napus* que comprende al menos dos genes *IND*, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, caracterizada por que comprende al menos dos alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos en su genoma, en la que dicho alelo *IND* mutante parcialmente genosuprimido es un alelo *IND* que produce una proteína *IND* en la que al menos un aminoácido seleccionado del aminoácido en una posición que corresponde a la posición 124 de SEC ID NO: 2, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 146 de SEC ID NO: 2, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 159 de SEC ID NO: 2, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 136 de SEC ID NO: 4, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 139 de SEC ID NO: 4, o el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 142 de SEC ID NO: 4, se sustituye por otro aminoácido, de manera que la actividad biológica de la proteína *IND* producida se reduce pero no se anula completamente en comparación con la proteína *IND* funcional de tipo salvaje correspondiente.
- 10 2. Una planta según la reivindicación 1, en la que los genes *IND* son genes *IND-A1* o *IND-C1*.
3. Una planta según la reivindicación 1 o 2, en la que los genes *IND* comprenden una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:
  - 15 (a) una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3 desde el nucleótido en la posición 46 al nucleótido en la posición 633, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5, o SEC ID NO: 7;
  - (b) una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 al aminoácido en la posición 210, o SEC ID NO: 4.
- 20 4. Una planta según la reivindicación 2 o 3, en la que los alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos son alelos *IND* mutantes del gen *IND-C1*.
5. Una planta según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos se seleccionan del grupo que consiste en *ind-a1-EMS06*, *ind-a1-EMS09*, *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS04*, *ind-c1-EMS08* e *ind-c1-EMS09*, habiéndose depositado las semillas representativas que comprenden dichos alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos con los números de depósito NCIMB 41570, NCIMB 41571, NCIMB 41572, NCIMB 41575, NCIMB 41573 o NCIMB 41574 respectivamente.
- 25 6. Una planta según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos un alelo *IND* mutante totalmente genosuprimido en su genoma.
- 30 7. Una planta según la reivindicación 6, en la que el alelo *IND* mutante totalmente genosuprimido se selecciona del grupo que consiste en
  - un alelo *IND* que tiene la secuencia de SEC ID NO: 1, en la que la C en la posición 364 está sustituida por T;
  - un alelo *IND* que tiene la secuencia de SEC ID NO: 1, en la que la G en las posiciones 307 y 380 está sustituida por A;
  - 35 - un alelo *IND* que tiene la secuencia de SEC ID NO: 3, en la que la C en la posición 148 está sustituida por T; y
  - un alelo *IND* que tiene la secuencia de SEC ID NO: 3, en la que la C en la posición 403 está sustituida por T.
8. Una planta según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es homocigota para el alelo *IND* mutante parcial y/o totalmente genosuprimido.
- 40 9. Una planta según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el desgranado de las semillas de la planta está reducido o retrasado en comparación con el desgranado de las semillas de una planta correspondiente que no comprende alelos *IND* mutantes.
10. Una planta según la reivindicación 9, que mantiene una capacidad de trilla agronómicamente relevante de las vainas.
- 45 11. Una planta de *Brassica napus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que comprende dos alelos *IND* mutantes parcialmente genosuprimidos en un locus en su genoma.
12. La planta según la reivindicación 11, en la que dichos dos alelos *IND* mutantes son homocigotos.