

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 697**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2007 PCT/IB2007/001540**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2007 WO07099459**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2007 E 07734815 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 1976983**

54 Título: **Mutantes de FAD-2 y plantas con alto contenido de ácido oleico**

30 Prioridad:

04.01.2006 EP 06290028

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2017

73 Titular/es:

**MONSANTO S.A.S. (100.0%)
EUROPARC DU CHENE, 1, RUE JACQUES
MONOD
69673 LYON CEDEX, FR**

72 Inventor/es:

**DESPEGHEL, JEAN-PIERRE y
GRANIER, CHRISTEL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 609 697 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

Mutantes de FAD-2 y plantas con alto contenido de ácido oleico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a plantas, semillas y productos derivados de las mismas, en particular a plantas de Brassica, productos de semillas derivadas de las mismas, que tienen secuencias mutantes que confieren un alto perfil de ácido oleico al aceite de semilla.

Más particularmente, la presente invención se refiere a secuencias mutantes de ácido graso delta-12 desaturasa, también denominadas aquí como secuencias de FAD2, en tales plantas que confieren un alto perfil de ácido oleico sobre el aceite de semilla.

10 Antecedentes

La Delta-12 de ácido graso desaturasa (también conocida como desaturasa oleica u oleato desaturasa) está involucrada en la conversión enzimática de ácido oleico en ácido linoleico.

15 Las variedades con alto nivel de ácido oleico (posiblemente combinado con bajo nivel de ácido linolénico) se buscan para muchas aplicaciones diferentes (aplicaciones de alimentos, aplicaciones de salud, aplicaciones de biodiesel y muchas otras).

Las semillas mutantes que proveen un aceite que presentaba un alto contenido de ácido oleico (contenido de ácido oleico mayor que 70% en peso con base en el peso total de ácidos grasos presentes en el aceite) previamente descritas en la literatura tenían un valor agronómico muy pobre y/o tenían malas características de raíz, y/o una capacidad de rendimiento muy baja, véase, por ejemplo, el documento WO98/56239.

20 Todavía existe la necesidad por material que tenga un alto contenido estable de ácido oleico (posiblemente combinado con un bajo contenido estable de ácido linolénico) a lo largo de los lugares y a lo largo de los años, con también buenos rendimientos agronómicos y con morfología de semilla oleaginosa de colza normal. En particular, las plantas no deben tener fasciación y deben tener un desarrollo normal de las raíces.

Resumen de la invención

25 El asunto objeto de la presente invención se muestra en las reivindicaciones.

Una molécula de ácido nucleico preferida de la invención comprende (o consiste de) un ácido nucleico de SEQ ID NO 1, 5, 11 o 12, su forma complementaria o su forma de ARN.

30 Una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender o consistir de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% e incluso más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO 1 o 11, o con la forma complementaria o forma de ARN del mismo, que codifica una proteína FAD2 que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 108 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre.

35 Una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender o consistir de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% e incluso más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO 5 o 12, o con la forma complementaria o forma de ARN del mismo, que codifica una proteína FAD2 que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 118 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre.

Más particularmente, dicha proteína FAD2 de tipo silvestre comprende (o consiste de) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4 u 8.

40 También es objeto de la presente invención un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100 o más nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho fragmento el codón mutado que corresponde a dicha sustitución de aminoácido en la posición 108 y/o codón mutado que corresponde a dicha sustitución de aminoácidos en la posición 118.

Dichos fragmentos se pueden usar como cebadores, sondas y/o marcadores seleccionables.

45 Una proteína FAD2 preferida de la invención comprende (o consiste de) una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 2 o 6.

Otro objeto de la presente invención es un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína FAD2 mutante de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la presente invención es una célula huésped que comprende un vector de la invención y/o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína FAD2 mutante de acuerdo con la invención.

5 Otro objeto de la presente invención es una planta transformada de forma estable con un vector de la invención.

Una planta que se va a transformar puede seleccionarse del grupo que consiste de cultivos productores de aceite, más particularmente, de girasol, soja, algodón, maíz y/o semillas de colza.

10 Otro objeto de la presente invención es una planta o una parte de planta o una semilla que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína FAD-2 que tiene una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a la posición 108 con respecto a una proteína FAD-2 de tipo silvestre.

Más en particular, una planta o una parte de planta o una semilla de acuerdo con la invención contiene (o expresa) una proteína FAD-2 que tiene una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a la posición 108 con respecto a una proteína FAD-2 de tipo silvestre.

15 Otro objeto de la presente invención es una planta o una parte de planta o una semilla que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína FAD-2 que tiene una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a la posición 118 con respecto a una proteína FAD-2 de tipo silvestre.

Más particularmente, una planta o una parte de planta o una semilla de acuerdo con la invención contiene (o expresa) una proteína FAD-2 que tiene una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a la posición 118 con respecto a una proteína FAD-2 de tipo silvestre.

20 Otro objeto de la presente invención es una planta o una parte de planta o una semilla que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína FAD-2 que tiene una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a la posición 108 y una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a la posición 118 con respecto a una proteína FAD-2 de tipo silvestre.

25 Más particularmente, una planta o una parte de planta o una semilla de acuerdo con la invención contiene (o expresa) una proteína FAD-2 que tiene una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a 108 y una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a la posición 118 con respecto a una proteína FAD-2 de tipo silvestre.

30 Otro objeto de la presente invención es una planta o una parte de planta o una semilla que contiene una primera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína FAD-2 que tiene una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a la posición 108 y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una proteína FAD-2 que tiene una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a la posición 118 con respecto a una proteína FAD-2 de tipo silvestre.

35 Más particularmente, una planta o una parte de planta o una semilla de acuerdo con la invención contiene (o expresa) dos proteínas FAD-2, una que tiene una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a 108 y la otra que tiene una sustitución de aminoácidos en o que corresponde a la posición 118 en relación con una proteína FAD-2 de tipo silvestre.

Preferiblemente, dicho aminoácido sustituido en o que corresponde a la posición 108 es ácido aspártico (que reemplaza una Glicina en una proteína FAD2 de tipo silvestre).

40 El aceite vegetal obtenido a partir de semillas de la presente invención comprende más de (aproximadamente) 72%, 75%, 80% u 85% de ácido oleico con base en el peso total de los ácidos grasos presentes en el aceite de colza.

Preferiblemente, dicho aceite comprende además menos de (aproximadamente) 4%, 3.5%, 3%, 2%, 1% o 0.5% de ácido linolénico.

Los productos de la invención se pueden aplicar a productos alimenticios o de pienso que contienen y/o se preparan con una planta, una parte de planta, una semilla y/o un aceite vegetal como se ha descrito anteriormente.

45 Breve descripción de la figura

La figura 1 corresponde a la lista de secuencias de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Las plantas de la presente invención, más particularmente las plantas de Brassica, preferiblemente las variedades de *Brassica napus*, proveen un aceite que tiene un contenido de ácido oleico superior al 70% en peso, con base en el peso total de ácidos grasos presentes en el aceite.

5 En el contexto de la presente invención, una parte o producto de una planta pretende abarcar una hoja, cotiledón, vástago, peciolo, tallo, semilla o cualquier otro tejido o fragmento de tejido de dicha planta.

En el contexto de la presente invención, el término "progenie" se refiere a descendientes directos e indirectos, genotipia y derivados de una planta o plantas de la invención e incluye la primera, segunda, tercera y/o generaciones subsecuentes, que pueden producirse por autocruce, cruce con plantas con el mismo o diferentes genotipos, y pueden ser modificados por rango de técnicas de ingeniería genética adecuadas.

10 En particular, la invención se basa en novedosas moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican novedosas formas variantes de proteína FAD2 que tienen un aminoácido sustituido en la posición 108 (o que corresponde a la posición 108) y/o un aminoácido sustituido en la posición 118 (o que corresponde a la posición 118) con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre, tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por SEQ ID NO 4 y/o SEQ ID NO 8.

15 Una molécula de ácido nucleico aislada de la invención contiene al menos una mutación, dando como resultado una sustitución, preferiblemente una sustitución de ácido aspártico por glicina, en (o que corresponde a) la posición 108 y/o dando como resultado una sustitución, preferiblemente una sustitución de fenilalanina por leucina, en (o que corresponde a) la posición 118 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre, tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por SEQ ID NO 4 y/o SEQ ID NO 8.

20 Dicha (s) mutación (es) altera (n) la funcionalidad del producto del gen FAD2 resultante, por lo que el nivel de ácido oleico se modifica, preferiblemente se incrementa, en plantas que expresan la secuencia o secuencias mutantes, en comparación con el nivel correspondiente en plantas que expresan la(s) secuencia(s) de tipo silvestre.

25 En el marco de la presente invención, excepto que se especifique otra cosa, el término "en la posición 108" debe entenderse que designa la posición de aminoácido 108 en una proteína FAD2 de tipo silvestre representada por la SEQ ID NO 4 y/o la SEQ ID NO 8, sino también como referencia al aminoácido que corresponde a dicha posición en una proteína FAD2 de tipo silvestre que tendría una secuencia de aminoácidos diferente debido a eliminaciones o aminoácidos adicionales en el polipéptido.

30 Del mismo modo, el término "en la posición 118" debe entenderse como designando la posición de aminoácido 118 en una proteína FAD2 de tipo silvestre representada por SEQ ID NO 4 y/o SEQ ID NO 8, sino también como referencia al aminoácido que corresponde a dicha posición en una proteína FAD2 tipo silvestre que tendría una secuencia de aminoácidos diferente debido a eliminaciones o aminoácidos adicionales en el polipéptido.

35 El término "que corresponde a la posición" tal como se utiliza aquí significa que una posición no sólo está determinada por el número de los aminoácidos precedentes. La posición de un aminoácido dado de acuerdo con la presente invención puede variar debido a eliminaciones o aminoácidos adicionales en el polipéptido. Por lo tanto, bajo una "posición correspondiente" de acuerdo con la presente invención, debe entenderse que el o los aminoácidos a los que se hace referencia pueden diferir en el número indicado, pero todavía tiene o tienen aminoácidos vecinos similares en la secuencia lineal.

40 Una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender (o consistir de) una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 3, 5, 7, 9, 10 o 12, en donde el codón que codifica el aminoácido en la posición 108 tiene al menos una mutación (o está mutado) para codificar un aminoácido diferente de la glicina y para codificar un ácido aspártico en la posición 108 de acuerdo con una proteína FAD2 de la invención.

Una molécula de ácido nucleico preferida de la invención comprende (o consiste de) una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 1 u 11.

45 Una molécula de ácido nucleico preferida de la invención comprende (o consiste de) una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO 5 o 12.

Una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender (o consistir de) una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 1, 3, 7, 9, 10 u 11, en donde se ha eliminado el codón que codifica el aminoácido en la posición 118.

50 Se apreciará por el experto en la técnica que las secuencias de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO 1 a 12 (es decir, SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11 y 12) no son las únicas secuencias que pueden usarse para proveer una proteína FAD2 de la invención. También se contemplan cualesquiera moléculas de ácido nucleico que tienen diferentes secuencias pero que, debido a la degeneración del código genético, codifican una proteína FAD2 que comprende

una sustitución de un aminoácido en la posición 108 (o que corresponde a la posición 108) y/o una sustitución de un aminoácido en la posición 118 (o que corresponde a la posición 118) con respecto a la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre, tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por las SEQ ID NO 4 u 8.

5 En particular, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender (o consistir de) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% e incluso más preferiblemente al menos 95%, 96% 97%, 98% o 99% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 12 (es decir, SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11 y 12), o con la forma complementaria o forma de ARN de la misma, que codifica una proteína FAD2 que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 108 y/o 118 en relación con una proteína FAD2 de tipo silvestre, tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por las SEQ ID NO 4 u 8.

10 Más particularmente, una molécula de ácido nucleico de la invención exhibe una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80%, se divulga que preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% e incluso más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11 y 12, o con la forma complementaria o forma de ARN de la misma y codifica una proteína FAD2 que tiene una sustitución de un ácido aspártico por una glicina en la posición 108 (o que corresponde a la posición 108) y/o una sustitución de una fenilalanina por una leucina en la posición 118 (o que corresponde a la posición 118) con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4 u 8.

Una molécula de ácido nucleico de la invención puede derivarse de variedades de *Brassica napus*, tales como MSP05, MSP06, MSP07, MSP11 y/o 28DHS.059.

20 Más particularmente, una molécula de ácido nucleico de la invención tiene una mutación en la posición 1540 (también denominada como SNP1540) de la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 11, que causa un cambio en el codón genético de GGC a GAC, dando como resultado una sustitución de un aminoácido en la posición 108 (o que corresponde a la posición 108) con respecto a la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre, tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por las SEQ ID NO 4 u 8.

25 Una molécula de ácido nucleico aislada de la invención que contiene dicha mutación SNP1540, que da como resultado una sustitución del ácido aspártico por glicina en la posición 108, altera la funcionalidad del producto del gen FAD2 resultante, por lo que el nivel de ácido oleico se incrementa en plantas que expresan la secuencia mutante, en comparación con el nivel correspondiente en la planta que expresa la secuencia de tipo silvestre.

30 En el marco de la invención, el término "SNP1540" se refiere al polimorfismo de nucleótido único que corresponde a dicha mutación en la posición 1540 del ácido nucleico de SEQ ID NO 11, y puede referirse también a la mutación correspondiente en cualquier molécula de ácido nucleico que codifica una proteína FAD2 de la invención que tiene un aminoácido sustituido en la posición 108 (o que corresponde a la posición 108) con respecto a la proteína FAD2 de tipo silvestre, tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por las SEQ ID NO 4 u 8.

Se contempla cualquier fragmento de una molécula de ácido nucleico de la invención de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 100 o más nucleótidos que comprende dicha SNP1540.

35 Las moléculas de ácido nucleico derivadas de variedades de *Brassica napus*, tales como MSP05, MSP11 y/o 28DHS.059 tienen una mutación (SNP1590) que da como resultado una sustitución de un aminoácido en la posición 118 de la secuencia de tipo silvestre FAD2, tal como representado por la SEQ ID NO 8.

40 Más particularmente, una molécula de ácido nucleico tiene una mutación en la posición 1590 (también denominada como SNP1590) de la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 12, que provoca un cambio en el codón genético de CTT a TTT, dando como resultado una sustitución de un aminoácido en la posición 118 (o que corresponde a la posición 118) con respecto a la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre, tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por las SEQ ID NO 4 u 8.

45 Una molécula de ácido nucleico aislada que contiene dicha mutación SNP1590, da como resultado una sustitución de la fenilalanina por la leucina en la posición 118, altera la funcionalidad del producto del gen FAD2 resultante, por lo que el nivel de ácido oleico se incrementa en la planta que expresa la secuencia mutante, en comparación con el nivel correspondiente en la planta que expresa la secuencia de tipo silvestre.

50 En el marco de la invención, el término "SNP1590" se refiere al polimorfismo de nucleótido único que corresponde a dicha mutación en la posición 1590 del ácido nucleico de SEQ ID NO 12, y puede referirse también a la mutación correspondiente en cualquier molécula de ácido nucleico que codifica una proteína FAD2 de la invención que tiene un aminoácido sustituido en la posición 118 (o que corresponde a la posición 118) con respecto a la proteína FAD2 de tipo silvestre, tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por las SEQ ID NO 4 u 8.

Se divulgan fragmentos de una molécula de ácido nucleico de la invención de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 100 o más nucleótidos que comprenden dicha SNP1590.

También se contempla cualquier fragmento de una molécula de ácido nucleico de la invención de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 100 o más nucleótidos que comprenden dicha SNP1540 y dicha SNP1590.

- 5 Se divulga cualquier fragmento de una molécula de ácido nucleico de la invención de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 100 o más nucleótidos y que comprende al menos una mutación que da como resultado una proteína FAD2 de acuerdo con la invención.

- 10 En otras palabras, también se divulga cualquier fragmento de una molécula de ácido nucleico de la invención de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500 o más nucleótidos y que comprende al menos una mutación en el codón que codifica dicho aminoácido en la posición 108 (o que corresponde a la posición 108) y en el codón que codifica dicho aminoácido en la posición 118 (o que corresponde a la posición 118) con respecto a la proteína FAD2 de tipo silvestre, tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por la SEQ ID NO: 4 u 8.

Tales fragmentos se pueden usar como cebadores, como sondas y/o como marcadores.

- 15 Los fragmentos de ácido nucleico de la invención pueden usarse como marcadores en mapeo genético de plantas y programas de reproducción genética.

Tales marcadores pueden incluir, por ejemplo, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), detección de polimorfismo de amplificación aleatoria (RAPD), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o marcadores de replicación de secuencia autosostenida (3SR).

- 20 Pueden usarse técnicas de reproducción asistida por marcadores para identificar y seguir una planta de acuerdo con la invención o su progenie, también objeto de la invención, durante el proceso de reproducción.

Las técnicas de reproducción asistida por marcadores pueden utilizarse además o como alternativa a otros tipos de técnicas de identificación

Un ejemplo de reproducción asistida por marcadores es el uso de cebadores de PCR que amplifican específicamente una molécula de ácido nucleico de la invención.

- 25 La invención provee por lo tanto métodos para el análisis de segregación y selección de cruces genéticos que involucran plantas que tienen secuencias de ácidos nucleicos de la invención.

- 30 Un método puede involucrar, por ejemplo, determinar la presencia en un genoma de alelos FAD2 particulares que contienen al menos una mutación que da como resultado una sustitución (preferiblemente una sustitución de ácido aspártico por glicina) en (o que corresponde a) la posición 108 y/o que da como resultado una sustitución (preferiblemente una sustitución de la fenilalanina por la leucina) en (o que corresponde a) la posición 118 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre, tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por las SEQ ID NO 4 u 8.

- 35 Tal determinación puede lograrse, por ejemplo, con un rango de técnicas, tales como la amplificación por PCR, la toma de huellas de ADN, la toma de huellas de ARN, la transferencia en gel y el análisis por RFLP, los ensayos de protección de nucleasa, la secuenciación del fragmento de ácido nucleico relevante, la generación de anticuerpos (monoclonales o policlonal), o métodos alternativos adaptados para distinguir la proteína producida por los alelos relevantes de otras variantes/formas de esa proteína o del tipo silvestre.

- 40 Más particularmente, tales fragmentos pueden usarse en el método de selección asistida por marcadores para rasgos de alto oléico en plantas, preferiblemente en especies de Brassica, más particularmente en variedades de *Brassica napus*.

Las secuencias de nucleótidos recombinantes pueden comprender una o más secuencias reguladoras adyacentes. enlazadas operativamente a una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención. Tales secuencias reguladoras adyacentes se originan preferiblemente a partir de organismos homólogos

Sin embargo, dichas secuencias reguladoras adyacentes también se pueden originar de organismos heterólogos.

- 45 Dichas secuencias reguladoras adyacentes son secuencias específicas tales como promotores, potenciadores, secuencias de señal de secreción y/o terminadores.

Otro aspecto de la invención está relacionado con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, posiblemente enlazada operativamente a una o más secuencias reguladoras adyacentes que se originan de organismos homólogos o heterólogos.

En el presente contexto, se define "vector" como cualquier constructo bioquímica que puede usarse para la introducción de una secuencia de nucleótidos (por transducción, transfección, transformación, infección, conjugación, etc.) en una célula.

5 Ventajosamente, un vector de acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste de plásmidos (incluyendo plásmidos replicativos e integradores), virus, fagémidos, cromosomas, transposones, liposomas, vesículas catiónicas o una mezcla de los mismos. Dicho vector puede comprender ya una o más secuencias reguladoras adyacentes, lo que permite la expresión de dicha molécula de ácido nucleico y su transcripción en un polipéptido de la invención.

10 La invención se refiere también a un polipéptido FAD2 que tiene una sustitución de aminoácidos en (o que corresponde a) la posición 108 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre, tal como una proteína FAD2 de tipo silvestre representada por SEQ ID NO 4 u 8.

Más particularmente, un polipéptido FAD2 de la invención comprende (o consiste de) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 6 que comprende además una sustitución de ácido aspártico por glicina en la posición 108.

15 Un polipéptido FAD2 preferido de la invención comprende (o consiste de) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2.

Un polipéptido FAD2 preferido divulgado comprende (o consiste de) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 6.

La presente invención también abarca cualquier fragmento de una proteína FAD2 de la invención que tiene una actividad de delta-12 oleato desaturasa y que comprenden dichas sustituciones en la posición (108).

20 Las moléculas de ácido nucleico, moléculas de ácido nucleico recombinantes y/o vectores de la presente invención son útiles para transformar plantas objetivo y, por lo tanto, para conferir un producto génico de FAD2 alterado, por lo que el nivel de ácido oleico se modifica, preferiblemente aumentado, en planta que expresa un FAD2 mutante de la Invención, en comparación con el nivel correspondiente en la planta que expresa la secuencia de tipo silvestre.

25 La presente invención también está relacionada con una célula huésped transformada, o célula huésped recombinante, que contiene (o que tiene incorporado) una o más de las secuencias de nucleótidos y/o vectores de acuerdo con la invención.

30 En el presente contexto, una "célula huésped transformada" o "célula recombinante", también denominada "transformante", es una célula que tiene incorporada una o más de las secuencias de nucleótidos y/o vectores de acuerdo con la invención. La célula huésped transformada puede ser una célula en la que dichos vectores y/o dichas secuencias nucleotídicas introducen mediante transformación genética, preferiblemente por medio de recombinación homóloga, o por cualquier otro método bien conocido utilizado para obtener un organismo recombinante.

Se contempla por la presente invención cualquier método mediante el cual se pueda incorporar la novedosa secuencia al genoma del huésped.

35 Más particularmente, se contempla por la presente invención cualquier método mediante el cual se pueda incorporar la nueva secuencia en el genoma huésped, y heredarse de manera estable por su progenie.

Actualmente existe un amplio rango de técnicas conocidas para conseguir la transformación directa o indirecta de plantas superiores con ADN exógeno.

40 La transformación de las células vegetales puede medirse mediante el uso de vectores. Un método común para lograr la transformación es el uso de *Agrobacterium tumefaciens* para introducir un gen extraño en la célula de la planta objetivo.

Los virus de plantas también proveen un posible medio para la transferencia de ADN exógeno.

45 También puede emplearse la captación directa de células vegetales. Típicamente, los protoplastos de la planta objetivo se colocan en cultivo en presencia de las moléculas de ácido nucleico que se van a transferir, y un agente que promueve la captación de dichas moléculas de ácido nucleico por protoplastos. Los agentes útiles a este respecto son polietilenglicol o fosfato de calcio.

50 Alternativamente, la captación de moléculas de ácido nucleico puede estimularse por electroporación. En este método, se utiliza un impulso eléctrico para abrir poros temporales en una membrana celular de protoplastos, y dichas moléculas de ácido nucleico en la solución circundante son entonces atraídas dentro de la célula a través de los poros. De forma similar, la microinyección puede emplearse para suministrar dichas moléculas de ácido nucleico directamente en una célula, y preferiblemente directamente en el núcleo de la célula.

En estas técnicas, la transformación se produce en una célula vegetal en cultivo. Subsecuente al evento de transformación, las células vegetales pueden regenerarse a plantas enteras.

Las técnicas para la regeneración de plantas maduras a partir de callos o cultivos de protoplastos son bien conocidas.

- 5 También están disponibles métodos alternativos que no necesariamente requieren el uso de células aisladas y, por lo tanto, técnicas de regeneración de plantas, para lograr la transformación. Estos métodos se denominan generalmente métodos "balísticos" o de "aceleración de partículas", en los que las moléculas de ácido nucleico recubiertas de partículas metálicas son propulsadas a las células vegetales mediante una carga de pólvora o una descarga eléctrica. De esta manera, las células vegetales en el cultivo o los órganos o células reproductoras de plantas, por ejemplo polen, se puede transformar establemente con las moléculas de ácido nucleico de interés.

10 La presente invención se puede aplicar a la transformación de virtualmente cualquier tipo de planta, monocotiledóneas o dicotiledóneas.

15 Las plantas adecuadas para ser transformadas son preferiblemente cultivos productores de aceites, tales como girasol, soja, algodón, maíz, etc., preferiblemente especies de Brassica, más preferiblemente variedades de *Brassica napus*.

En un aspecto de la invención, una planta comprende al menos una secuencia codificante de FAD2 de la invención.

Una planta de la invención puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 5 o una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 12.

20 Preferiblemente, una planta de la invención comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 11 o una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 1, tal como MSP06 o MSP07.

En otro aspecto de la invención, una planta comprende dos secuencias codificadoras de FAD2 de la invención.

En particular, una planta de la invención comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 11 y una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 12, tal como MSP05, MSP11 o 28DHS.059.

25 Preferiblemente, una planta de la invención comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 1 y una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 5, tal como MSP05, MSP11 o 28DHS.059.

La variedad MSP06 se mantiene como depósito de patente del Tratado de Budapest con NCIMB bajo el número de acceso NCIMB 41367 hecho el 22 de diciembre de 2005.

La variedad MSP07 se mantiene como depósito de patente del Tratado de Budapest con NCIMB bajo el número de acceso NCIMB 41368 hecho el 22 de diciembre de 2005.

30 28DHS.059 se mantiene como depósito de patente del Tratado de Budapest con NCIMB bajo el número de acceso NCIMB 41364 hecho el 22 de diciembre de 2005.

La variedad MSP05 se mantiene como depósito de patente del Tratado de Budapest con NCIMB bajo el número de acceso NCIMB 41233 hecho el 9 de julio de 2004.

35 La variedad MSP11 se mantiene como depósito de patente del Tratado de Budapest con NCIMB bajo el número de acceso NCIMB 41234 hecho el 9 de julio de 2004.

También se divulga un método para producir líneas de plantas oleicas elevadas que comprende:

- 40 (a) cruzar una primera planta con una segunda planta que tiene al menos un gen FAD2 mutante de acuerdo con la invención, (b) obtener semillas del cruce de la etapa (a), c) cultivar plantas fértiles a partir de tales semillas; (d) obtener semillas de progenie de las plantas de la etapa (c) y (e) identificar aquellas semillas entre la progenie que tienen alto contenido de ácido oleico.

En otro aspecto, la invención provee un método para incrementar el contenido de ácido oleico de plantas, más particularmente de plantas de Brassica, y preferiblemente de plantas de *Brassica napus*, que comprende las etapas de:

45 (a) inducir mutagénesis en al menos algunas células de una planta, más particularmente de una planta de Brassica, y preferiblemente de una planta de *Brassica napus* que tiene un contenido de ácido oleico de menos del 70%;

(b) regenerar plantas a partir de al menos una de dichas células mutagenizadas; y

(c) seleccionar plantas regeneradas que tienen una secuencia de ácidos nucleicos de la invención y/o que expresan una proteína FAD2 de la invención.

5 Preferiblemente, las semillas obtenidas a partir de dichas plantas proveen un aceite que tiene un contenido de ácido oleico de más de 70% en peso, más preferiblemente de más de 75% en peso, con base en el peso total de ácido graso presente en el aceite.

El aceite vegetal obtenido de al menos una planta de acuerdo con la invención comprende más de (aproximadamente) 70%, 72%, 75%, 80%, u 85% de ácido oleico.

10 Más particularmente, un aceite vegetal obtenido preferiblemente de al menos una especie de Brassica de la invención, más preferiblemente de al menos una variedad de *Brassica napus* de acuerdo con la invención, comprende más de (aproximadamente) 70%, 72%, 75%, 80%, o 85% de ácido oleico. Dicho aceite puede comprender además menos de (aproximadamente) 4%, 3,5%, 3%, 2%, 1% o 0,5% de ácido linolénico, con base en el peso total de los ácidos grasos presentes en el aceite.

15 Preferiblemente, dicho aceite comprende más de (aproximadamente) 70%, 72%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% o 90% preferiblemente entre (aproximadamente) 70% y (aproximadamente) 90%, más preferiblemente entre (aproximadamente) 72% y (aproximadamente) 89% de ácido oleico. Dicho aceite puede comprender además menos de (aproximadamente) 4%, 3,5%, 3%, 2%, 1%, o 0.5%, preferiblemente entre (aproximadamente) 4% y (aproximadamente) 0.4% de ácido linolénico, con base en el peso total de los ácidos grasos presentes en el aceite.

20 De acuerdo con una realización preferida, dos variedades dobles bajas de semilla de colza de invierno (ENVOL y LIBERATOR) fueron sometidas a un tratamiento con Metano Sulfonato de Etilo (EMS) en 1992. El tratamiento con EMS se realizó al 2.5% y 5% durante 4h u 8h.

La generación M1 se cultivó en un invernadero después de 8 semanas de vernalización en una cámara de crecimiento y luego se cosechó en julio del 93.

25 Las semillas M1 fueron sembradas en el campo en septiembre del 93, ensacadas al inicio de la floración y las semillas M2 cosechadas en julio del 94.

Las semillas M2 fueron sembradas en septiembre del 94, ensacadas al inicio de la floración y las semillas M3 cosechadas en julio del 95.

Las progenies fueron entonces analizadas para determinar la composición de ácidos grasos usando un método analítico con base en cromatografía de gases, como se conoce comúnmente en esta área de la tecnología.

30 Se mantuvieron todas las progenies que mostraban un contenido oleico superior al 68%.

La progenie seleccionada fue replantada en el campo en septiembre de 1995, ensacada en abril y luego cosechada en julio de 1996.

35 En esta etapa, las progenies fueron sometidas a tamizaje para obtener buenas características agronómicas y morfológicas, tales como buena capacidad de germinación, buen vigor de otoño, buena resistencia al invierno, buen sistema de enraizamiento, buena resistencia a la pata negra y la mancha clara de la hoja, así como excelente resistencia al hospedaje.

El material que era demasiado alto y tardío fue eliminado, así como el material que muestra fuerte fasciación

40 El análisis de la progenie restante se realizó de nuevo mediante cromatografía de gases para seleccionar individuos con niveles de ácido oleico superiores al 68%. Todos estos individuos fueron plantados en el campo en septiembre de 1996-1997.

Una progenie llamada MUT 152-96 parecía particularmente interesante en términos de características agronómicas y morfológicas, así como por su contenido de ácido oleico. Se cultivó en aislamiento durante la temporada de cultivo de septiembre de 1996-1997. Las progenies más interesantes en términos de características agronómicas y morfológicas fueron seleccionadas para el ensacado y el cruce.

45 El cruzamiento se realizó con variedades dobles bajas de semilla de colza de invierno que tienen un perfil convencional de ácidos grasos (es decir, ácido oleico por debajo del 70%) o con bajo contenido de ácido linolénico (es decir, menos de aproximadamente 3.5%) con el fin de desarrollar líneas con alto contenido de ácido oleico asociadas con bajo contenido de ácido linolénico (HOLL).

El material avanzó en la reproducción de pedigrí, autopolinización hasta al menos la generación F7.

ES 2 609 697 T3

En todas las generaciones se aplicó una fuerte presión de selección contra la fasciación y para el desarrollo normal de la planta y el sistema normal de enraizamiento.

Se monitorizó la composición de ácidos grasos en cada generación y se mantuvo solamente material con contenido de ácido oleico superior al 75% y contenido de ácido linolénico inferior al 3.5%.

- 5 Se obtuvieron las siguientes variedades HOLL mediante este proceso: MSP05, MSP06, MSP07, MSP11, 28 DHS 059.

Las variedades dobles bajas con perfiles convencionales de ácidos grasos utilizados en este trabajo fueron BRISTOL, CAPITOL, CAPVERT, VIVOL y CAIMAN y estas se han multiplicado o mantenido utilizando el mismo esquema de mantenimiento descrito aquí anteriormente para las líneas HOLL

- 10 Se utilizó semilla básica para la determinación del contenido de ácidos grasos en ensayos - pequeños ensayos de investigación (6 a 12 m²) o ensayos de desarrollo (500 m²) y para el trabajo de secuenciación.

Ejemplos

Ejemplo 1

- 15 Las semillas se trituraron en una primera solución que consistía en metanol (800 ml), trimetil pentano (200 ml) y 5 g de NaOH. Se utilizaron aproximadamente 3 ml de solución para aproximadamente 10 g de semillas (en otras palabras, aproximadamente 10 a 50 semillas para 1 ml de solución).

La extracción se realizó durante 20 minutos y posteriormente se añadió una segunda solución, que consistía de trimetilamina (900 ml) y propanol, 2- (100 ml), en el mismo volumen que la primera solución.

La solución resultante se sometió a vórtex y se dejó reposar hasta la formación de una fase superior.

- 20 La fase superior fue muestreada y transferida a viales.

Se inyectó un microlitro de la misma en un cromatógrafo de gases (Fisons de termoelectrón con un columna DB3 - 30 metros con un diámetro de 0.25 mm y un espesor de 25 micrómetros). El tiempo de ejecución fue de aproximadamente 4 min.

Los resultados del contenido de ácido oleico se resumen en la tabla 1

25

Tabla 1

Variedades	Contenido de ácido oleico (% en peso)	Apreciación
MSP05	78,1-81,9	Muy alto
MSP06	75,6-78,5	Alto
MSP07	76,7-79,4	Alto
MSP11	80,2-83,9	Muy alto
28DHS059	83,8-84,9	Muy alto
BRISTOL	61,4-65,7	Normal
VIVOL	60,8-63,2	Normal
CAPVERT	58,9-65,9	Normal
CAIMAN	61,9-64,0	Normal
CAPITOL	59,7-64,6	Normal

El contenido de ácido oleico se basa en el peso total del ácido graso en el aceite extraído.

Ejemplo 2

Los materiales vegetales utilizados para la secuenciación son:

- 30 - líneas mutantes con mayor contenido en ácidos grasos oleicos: MSP05, MSP06, MSP07, MSP11 y 28DHS.059; y
- variedades de tipo silvestre con contenido normal de ácido oleico: Bristol, Capital, Vivol, Capvert y Caiman.

ES 2 609 697 T3

Todas estas líneas se cultivaron en una cámara de crecimiento y los cotiledones y tallos se recolectaron de plantas de 7 días de edad.

Los tejidos vegetales se secaron por congelación y se utilizaron para la extracción de ADN.

El ADN se aisló con kits de ADN de Qiagen Plant (Qiagen INC.-USA, Valencia CA).

5 La PCR se realizó con el protocolo TaqGold (AB Biosystem, Inc.).

La mezcla de reacción incluye 2.5 µl de regulador 10x, 0.2 µl de TaqGold, 0.2 µl de dNTP (25 mM), cebadores de 2 µl (5 µM) y 10 µl de plantilla de ADN (2ng/µl) y 10.1 µl de H₂O.

10 Los ciclos de PCR fueron los siguientes: 94°C 5 min; 8 ciclos de 94°C 40 seg, 62°C 40 seg, 72°C 1 min, 94°C 40 seg, 60°C 40 seg, 72°C 1 min, 94°C 40 seg, 58°C 40 seg, 72°C 1 min, 94°C 40 seg, 56°C 40 seg, 72°C 1 min; 3 ciclos de 94°C 40 seg, 55°C 40 seg, 72°C 1 min; mantener a 72°C durante 7 min.

Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1%.

Para la secuenciación, se retiraron 5 µl de productos de PCR a un nuevo tubo y 1 µl de Exonucleasa I (dilución 1:50) y 1 µl de Fosfatasa Alcalina de Camarón (dilución 1: 5).

La mezcla se incubó a 37°C durante 20 minutos y luego a 80°C durante 15 minutos para inactivar las enzimas.

15 Se añadieron 40 µl de H₂O y se usaron 6 µl como plantilla con 1 µl de cebador de secuenciación.

La secuenciación se realizó en Analizador de ADN 3730 (Applied Biosystems).

Las secuencias se ensamblaron y alinearon usando el programa SeqMan II de LaserGene (DNASTAR, INC, Madison, WI).

Ejemplo 3

20 Se descargaron del Genbank (NCBI) cuatro secuencias génicas de delta-12 oleato desaturasa de *Brassica napus* (FAD2), 4684997, 46399190, 8705228 y 4092878. Estas secuencias se utilizaron como interrogantes en BLAST contra la base de datos de secuencias de Monsanto.

25 Utilizando los programas "blastn" (NCBI), se obtuvieron una serie de resultados de alta puntuación. Todas las secuencias de éxito fueron descargadas y reensambladas con el programa SeqmanII (DNASTAR Inc, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

Se identificaron dos transcritos distintos y se designaron como Fad2-1 (SEQ ID NO 9) y Fad2-2 (SEQ ID NO 10). Fad2-1 y Fad2-2 comparten una alta homología de secuencia, con un 97% de identidad de secuencia.

Para identificar mutaciones causales asociadas con alto contenido de ácido oleico en las líneas mutantes y sus progenies, se diseñaron cebadores específicos de locus anidados para cubrir todas las secuencias.

30 El extremo 3' de un cebador estaba siempre situado en un nucleótido que diferenciaba Fad2-1 de Fad2-2 excepto aquellos situados en los extremos 5' y 3' de las secuencias consenso donde no había nucleótido diferencial entre los dos genes.

35 Los cebadores también se diseñaron de tal manera que un amplicón se solaparan con otro para asegurar la cobertura completa de toda la secuencia. Estos cebadores se dispusieron y se usaron para generar amplicones específicos de locus en mutantes y tipos silvestres. Los resultados de secuenciación indicaron que todos los cebadores de PCR específicos de locus se comportaron como se esperaba.

Las secuencias pertenecientes al mismo gen se ensamblaron en conjunto utilizando el programa SeqManII.

Las secuencias genómicas de consenso de los genes Fad2-1 y Fad2-2 mutados están representadas respectivamente por SEQ ID NO 11 y 12.

40 La Tabla 2 resume las características de la secuencia de ambos genes Fad2-1 y Fad2-2.

Tabla 2

Características	Posición de FAD2-1	Posición de FAD2-2
Gen	1 - 2614	1 - 2666

ES 2 609 697 T3

5' UTR	1 - 1217	1 - 1238
Exon	1 - 108	1 - 111
Intron	109 - 1213	112 - 1234
Exon	1214 - 2614	1235 - 2619
CDS	1218 - 2372	1239 - 2393
3'UTR	2373 - 2614	2394 - 2666

Las características se basan en las secuencias genómicas de consenso de múltiples lecturas en diferentes genotipos.

Ambos genes Fad2-1 y Fad2-2 tienen un intrón cada uno.

- 5 Los tamaños de intrones son ligeramente diferentes entre dos genes. Para Fad2-1, el intrón se extiende 1105 pb a partir de la posición 109 a 1213, mientras que para Fad2-2, el intrón consiste en 1123 pb a partir de la posición 112 a 1234 en las secuencias de consenso.

El intrón se encuentra en la región 5'UTR.

- 10 Los codones de iniciación de traducción putativos están situados en 1218 y 1239 para genes Fad2-1 y Fad2-2, respectivamente.

Los codones de terminación de traducción están situados en 2370-2372 y 2391-2393, respectivamente para Fad2-1 y Fad2-2.

Las secuencias 3'UTR son 247 pares de bases para los genes Fad2-1 y 273 pares de bases para los genes Fad2-2.

- 15 Se encontró una mutación de transición en la posición 1540 (denominada SNP1540) del gen FAD2-1 (como se representa por SEQ ID NO 11), que causó un cambio en el codón genético de GGC a GAC, dando como resultado una alternación del residuo de aminoácido de Glicina a Ácido aspártico.

Dado que la Glicina y el Ácido aspártico tienen propiedades muy diferentes en términos de hidrofobicidad, cargas y polaridad, etc., la mutación provoca un cambio radical en la función de la enzima en las líneas mutantes.

- 20 También se han descrito secuencias de aminoácidos altamente conservadas entre las desaturasas de ácido graso delta-12 de plantas y las desaturasas de ácido graso delta-15 de plantas (Patente de los Estados Unidos US6872872B1). Entre otros, uno de los motivos de secuencia de aminoácidos conservados mencionados es AHECGH. El SNP1540 pasó a situarse en el mismo motivo. El "G" en el motivo fue mutado a un "D". Debido a que las regiones conservadas usualmente implicaban una significación funcional o estructural, la mutación en esta región conservada ha causado efectos adversos sobre la enzima FAD2-1, dando como resultado un alto contenido de ácido oleico en las líneas mutantes MSP11, MSP05, MSP06, MSP07 y 28DHS.059.

Una mutación puntual en la posición 1590 (denominada SNP1590) del gen FAD2-2 (como se representa por la SEQ ID NO 12) causó un cambio de residuo de aminoácidos de leucina (CTT) a fenilalanina (TTT).

- 30 Tanto la leucina como la fenilalanina son de naturaleza hidrófoba y comparten algunas propiedades comunes de aminoácidos, pero la fenilalanina contiene un grupo aromático rígido grande en la cadena lateral que causa algún cambio en la función de la enzima.

Por otra parte, en combinación con la mutación SNP1540, esta mutación causa el efecto más visible en el fenotipo.

La combinación de diferentes alelos en estas mutaciones creó un gradiente en el contenido oleico como se observó en diferentes líneas mutantes (véase tabla 1).

- 35 Tres líneas mutantes, MSP11, MSP05 y 28DHS.059, portaron mutaciones dobles en SNP1540 y SNP1590. Dado que ambas mutaciones eran mutaciones de sentido contrario, las funciones del gen FAD2 se ven severamente afectadas, dando como resultado mayor contenido de ácido oleico entre las líneas mutantes.

El contenido oleico para MSP05 fue menor que los otros dos mutantes. Esto se debió a que el contenido oleico se obtuvo a partir de datos de un solo año que podrían estar sujetos a variaciones debido al efecto ambiental.

Dos líneas mutantes, MSP06 y MSP07, portaron una única mutación puntual en SNP1540. Puesto que son menos severos que los mutantes dobles, el contenido oleico para estas dos líneas estaba ligeramente por debajo de los mutantes dobles.

5 En resumen, los datos de secuencia indicaron fuertemente que estas mutaciones en Fad2-1 y Fad2-2 están altamente asociadas con contenidos oleicos en diferentes líneas mutantes.

La combinación de diferentes alelos explica todas las variaciones fenotípicas del contenido oleico en el material vegetal obtenido.

La identificación de las variaciones de la secuencia causal es crucial para diseñar los ensayos de diagnóstico específicamente para cada alelo mutante.

10 El conocimiento de la asociación entre variaciones de secuencia y fenotipos puede permitir diseñar ensayos de marcadores para predecir con precisión el contenido de ácido oleico en plantas sin necesidad de análisis químico en húmedo del contenido de ácidos grasos.

Listado de secuencias

<110> Monsanto S.A.S.

15 <120> Mutantes de FAD-2 y plantas con alto contenido de ácido oleico

<130> BP.MST0.07B/WO

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

20 <211> 1155

<212> ADN

<213> *Brassica napus*

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)..(1155)

<400> 1

ES 2 609 697 T3

atg Met 1	ggt Gly	gca Ala	ggt Gly	gga Gly 5	aga Arg	atg Met	caa Gln	gtg Val 10	tct Ser 10	cct Pro	ccc Pro	tcc Ser	aaa Lys	aag Lys 15	tct Ser	48
gaa Glu	acc Thr	gac Asp	aac Asn 20	atc Ile	aag Lys	cgc Arg	gta Val	ccc Pro 25	tgc Cys	gag Glu	aca Thr	ccg Pro	ccc Pro 30	ttc Phe	act Thr	96
gtc Val	gga Gly	gaa Glu 35	ctc Leu	aag Lys	aaa Lys	gca Ala	atc Ile 40	cca Pro	ccg Pro	cac His	tgt Cys	ttc Phe 45	aaa Lys	cgc Arg	tcg Ser	144
atc Ile	cct Pro 50	cgc Arg	tct Ser	ttc Phe	tcc Ser	tac Tyr 55	ctc Leu	atc Ile	tgg Trp	gac Asp 60	atc Ile	ata Ile	gcc Ala	tcc Ser	192	
tgc Cys 65	ttc Phe	tac Tyr	tac Tyr	gtc Val	gcc Ala 70	acc Thr	act Thr	tac Tyr	ttc Phe 75	cct Pro	ctc Leu	ctc Leu	cct Pro	cac His	cct Pro 80	240
ctc Leu	tcc Ser	tac Tyr	ttc Phe	gcc Ala 85	tgg Trp	cct Pro	ctc Leu	tac Tyr	tgg Trp 90	gcc Ala	tgc Cys	cag Gln	ggc Gly	tgc Cys 95	gtc Val	288
cta Leu	acc Thr	ggc Gly 100	gtc Val	tgg Trp	gtc Val	ata Ile	gcc Ala	cac His 105	gag Glu	tgc Cys	gac Asp	cac His	cac His 110	gcc Ala	ttc Phe	336
agc Ser	gac Asp	tac Tyr 115	cag Gln	tgg Trp	ctg Leu	gac Asp 120	gac Asp	acc Thr	gtc Val	ggc Gly	ctc Leu	atc Ile 125	ttc Phe	cac His	tcc Ser	384
ttc Phe 130	ctc Leu	ctc Leu	gtc Val	cct Pro	tac Tyr	ttc Phe 135	tcc Ser	tgg Trp	aag Lys	tac Tyr	agt Ser 140	cat His	cga Arg	cgc Arg	cac His	432
cat His 145	tcc Ser	aac Asn	act Thr	ggc Gly 150	tcc Ser	ctc Leu	gag Glu	aga Arg	gac Asp	gaa Glu 155	gtg Val	ttt Phe	gtc Val	ccc Pro	aag Lys 160	480
aag Lys	aag Lys	tca Ser	gac Asp	atc Ile	aag Lys	tgg Trp	tac Tyr	ggc Gly	aag Lys	tac Tyr	ctc Leu	aac Asn	aac Asn	cct Pro	ttg Leu	528

ES 2 609 697 T3

					165						170						175	
gga	cgc	acc	gtg	atg	tta	acg	gtt	cag	ttc	act	ctc	ggc	tgg	cct	ttg	576		
Gly	Arg	Thr	Val	Met	Leu	Thr	Val	Gln	Phe	Thr	Leu	Gly	Trp	Pro	Leu			
					180						185						190	
tac	tta	gcc	ttc	aac	gtc	tcg	ggg	aga	cct	tac	gac	ggc	ggc	ttc	gct	624		
Tyr	Leu	Ala	Phe	Asn	Val	Ser	Gly	Arg	Pro	Tyr	Asp	Gly	Gly	Phe	Ala			
					195						200						205	
tgc	cat	ttc	cac	ccc	aac	gct	ccc	atc	tac	aac	gac	cgt	gag	cgt	ctc	672		
Cys	His	Phe	His	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Tyr	Asn	Asp	Arg	Glu	Arg	Leu			
					210						215						220	
cag	ata	tac	atc	tcc	gac	gct	ggc	atc	ctc	gcc	gtc	tgc	tac	ggt	ctc	720		
Gln	Ile	Tyr	Ile	Ser	Asp	Ala	Gly	Ile	Leu	Ala	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu			
					225						230						235	240
tac	cgc	tac	gct	gct	gtc	caa	gga	gtt	gcc	tcg	atg	gtc	tgc	ttc	tac	768		
Tyr	Arg	Tyr	Ala	Ala	Val	Gln	Gly	Val	Ala	Ser	Met	Val	Cys	Phe	Tyr			
					245						250						255	
gga	gtt	cct	ctt	ctg	att	gtc	aac	ggg	ttc	tta	gtt	ttg	atc	act	tac	816		
Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Asn	Gly	Phe	Leu	Val	Leu	Ile	Thr	Tyr			
					260						265						270	
ttg	cag	cac	acg	cat	cct	tcc	ctg	cct	cac	tat	gac	tcg	tct	gag	tgg	864		
Leu	Gln	His	Thr	His	Pro	Ser	Leu	Pro	His	Tyr	Asp	Ser	Ser	Glu	Trp			
					275						280						285	
gat	tgg	ttg	agg	gga	gct	ttg	gcc	acc	gtt	gac	aga	gac	tac	gga	atc	912		
Asp	Trp	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gly	Ile			
					290						295						300	
ttg	aac	aag	gtc	ttc	cac	aat	atc	acg	gac	acg	cac	gtg	gcg	cat	cac	960		
Leu	Asn	Lys	Val	Phe	His	Asn	Ile	Thr	Asp	Thr	His	Val	Ala	His	His			
					305						310						315	320
ctg	ttc	tcg	acc	atg	ccg	cat	tat	cac	gcg	atg	gaa	gct	acg	aag	gcg	1008		
Leu	Phe	Ser	Thr	Met	Pro	His	Tyr	His	Ala	Met	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala			
					325						330						335	
ata	aag	ccg	ata	ctg	gga	gag	tat	tat	cag	ttc	gat	ggg	acg	ccg	gtg	1056		
Ile	Lys	Pro	Ile	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Gln	Phe	Asp	Gly	Thr	Pro	Val			
					340						345						350	
gtt	aag	gcg	atg	tgg	agg	gag	gcg	aag	gag	tgt	atc	tat	gtg	gaa	ccg	1104		
Val	Lys	Ala	Met	Trp	Arg	Glu	Ala	Lys	Glu	Cys	Ile	Tyr	Val	Glu	Pro			
					355						360						365	
gac	agg	caa	ggt	gag	aag	aaa	ggt	gtg	ttc	tgg	tac	aac	aat	aag	tta	1152		
Asp	Arg	Gln	Gly	Glu	Lys	Lys	Gly	Val	Phe	Trp	Tyr	Asn	Asn	Lys	Leu			
					370						375						380	
tga															1155			

<210> 2

<211> 384

<212> PRT

5 <213> *Brassica napus*

<400> 2

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Gln Val Ser Pro Pro Ser Lys Lys Ser

ES 2 609 697 T3

1				5						10					15
Glu	Thr	Asp	Asn	Ile	Lys	Arg	Val	Pro	Cys	Glu	Thr	Pro	Pro	Phe	Thr
			20					25					30		
Val	Gly	Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Ile	Pro	Pro	His	Cys	Phe	Lys	Arg	Ser
		35					40					45			
Ile	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Tyr	Leu	Ile	Trp	Asp	Ile	Ile	Ile	Ala	Ser
	50					55					60				
Cys	Phe	Tyr	Tyr	Val	Ala	Thr	Thr	Tyr	Phe	Pro	Leu	Leu	Pro	His	Pro
65					70					75					80
Leu	Ser	Tyr	Phe	Ala	Trp	Pro	Leu	Tyr	Trp	Ala	Cys	Gln	Gly	Cys	Val
				85					90					95	
Leu	Thr	Gly	Val	Trp	Val	Ile	Ala	His	Glu	Cys	Asp	His	His	Ala	Phe
			100					105					110		
Ser	Asp	Tyr	Gln	Trp	Leu	Asp	Asp	Thr	Val	Gly	Leu	Ile	Phe	His	Ser
		115					120					125			
Phe	Leu	Leu	Val	Pro	Tyr	Phe	Ser	Trp	Lys	Tyr	Ser	His	Arg	Arg	His
	130					135					140				
His	Ser	Asn	Thr	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Asp	Glu	Val	Phe	Val	Pro	Lys
145					150					155					160
Lys	Lys	Ser	Asp	Ile	Lys	Trp	Tyr	Gly	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asn	Pro	Leu
				165					170					175	
Gly	Arg	Thr	Val	Met	Leu	Thr	Val	Gln	Phe	Thr	Leu	Gly	Trp	Pro	Leu
			180					185					190		
Tyr	Leu	Ala	Phe	Asn	Val	Ser	Gly	Arg	Pro	Tyr	Asp	Gly	Gly	Phe	Ala
		195					200					205			
Cys	His	Phe	His	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Tyr	Asn	Asp	Arg	Glu	Arg	Leu
	210					215					220				
Gln	Ile	Tyr	Ile	Ser	Asp	Ala	Gly	Ile	Leu	Ala	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu
225					230					235					240
Tyr	Arg	Tyr	Ala	Ala	Val	Gln	Gly	Val	Ala	Ser	Met	Val	Cys	Phe	Tyr
				245					250					255	
Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Asn	Gly	Phe	Leu	Val	Leu	Ile	Thr	Tyr
			260					265					270		

ES 2 609 697 T3

Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp
 275 280 285
 Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile
 290 295 300
 Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His
 305 310 315 320
 Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala
 325 330 335
 Ile Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Val
 340 345
 Val Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro
 355 360 365
 Asp Arg Gln Gly Glu Lys Lys Gly Val Phe Trp Tyr Asn Asn Lys Leu
 370 375 380

<210> 3

<211> 1155

5 <212> ADN

<213> *Brassica napus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1155)

10 <400> 3

ES 2 609 697 T3

atg	ggt	gca	ggt	gga	aga	atg	caa	gtg	tct	cct	ccc	tcc	aaa	aag	tct	48
Met	Gly	Ala	Gly	Gly	Arg	Met	Gln	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	Lys	Lys	Ser	
1			5					10					15			
gaa	acc	gac	aac	atc	aag	cgc	gta	ccc	tgc	gag	aca	ccg	ccc	ttc	act	96
Glu	Thr	Asp	Asn	Ile	Lys	Arg	Val	Pro	Cys	Glu	Thr	Pro	Pro	Phe	Thr	
			20				25					30				
gtc	gga	gaa	ctc	aag	aaa	gca	atc	cca	ccg	cac	tgt	ttc	aaa	cgc	tcg	144
Val	Gly	Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Ile	Pro	Pro	His	Cys	Phe	Lys	Arg	Ser	
		35				40						45				
atc	cct	cgc	tct	ttc	tcc	tac	ctc	atc	tgg	gac	atc	atc	ata	gcc	tcc	192
Ile	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Tyr	Leu	Ile	Trp	Asp	Ile	Ile	Ile	Ala	Ser	
	50					55				60						
tgc	ttc	tac	tac	gtc	gcc	acc	act	tac	ttc	cct	ctc	ctc	cct	cac	cct	240
Cys	Phe	Tyr	Tyr	Val	Ala	Thr	Thr	Tyr	Phe	Pro	Leu	Leu	Pro	His	Pro	
65				70					75						80	
ctc	tcc	tac	ttc	gcc	tgg	cct	ctc	tac	tgg	gcc	tgc	cag	ggc	tgc	gtc	288
Leu	Ser	Tyr	Phe	Ala	Trp	Pro	Leu	Tyr	Trp	Ala	Cys	Gln	Gly	Cys	Val	
				85					90					95		

ES 2 609 697 T3

cta acc ggc gtc tgg gtc ata gcc cac gag tgc ggc cac cac gcc ttc	336
Leu Thr Gly Val 100 Trp Val Ile Ala His 105 Glu Cys Gly His 110 His Ala Phe	
agc gac tac cag tgg ctg gac gac acc gtc ggc ctc atc ttc cac tcc	384
Ser Asp Tyr 115 Gln Trp Leu Asp Asp 120 Thr Val Gly Leu 125 Ile Phe His Ser	
ttc ctc ctc gtc cct tac ttc tcc tgg aag tac agt cat cga cgc cac	432
Phe Leu 130 Leu Val Pro Tyr Phe 135 Ser Trp Lys Tyr Ser 140 His Arg Arg His	
cat tcc aac act ggc tcc ctc gag aga gac gaa gtg ttt gtc ccc aag	480
His Ser Asn Thr Gly Ser 150 Leu Glu Arg Asp 155 Glu Val Phe Val Pro Lys 160	
aag aag tca gac atc aag tgg tac ggc aag tac ctc aac aac cct ttg	528
Lys Lys Ser Asp 165 Ile Lys Trp Tyr Gly Lys 170 Tyr Leu Asn Asn Pro Leu 175	
gga cgc acc gtg atg tta acg gtt cag ttc act ctc ggc tgg cct ttg	576
Gly Arg Thr Val 180 Met Leu Thr Val 185 Gln Phe Thr Leu Gly Trp Pro Leu 190	
tac tta gcc ttc aac gtc tcg ggg aga cct tac gac ggc ggc ttc gct	624
Tyr Leu Ala 195 Phe Asn Val Ser Gly 200 Arg Pro Tyr Asp Gly Gly Phe Ala	
tgc cat ttc cac ccc aac gct ccc atc tac aac gac cgt gag cgt ctc	672
Cys His 210 Phe His Pro Asn Ala 215 Pro Ile Tyr Asn Asp 220 Arg Glu Arg Leu	
cag ata tac atc tcc gac gct ggc atc ctc gcc gtc tgc tac ggt ctc	720
Gln Ile Tyr Ile Ser Asp 230 Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu 240	
tac cgc tac gct gct gtc caa gga gtt gcc tcg atg gtc tgc ttc tac	768
Tyr Arg Tyr Ala 245 Val Gln Gly Val Ala 250 Ser Met Val Cys Phe Tyr 255	
gga gtt cct ctt ctg att gtc aac ggg ttc tta gtt ttg atc act tac	816
Gly Val Pro Leu 260 Leu Ile Val Asn Gly 265 Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr	
ttg cag cac acg cat cct tcc ctg cct cac tat gac tcg tct gag tgg	864
Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu 280 Pro His Tyr Asp Ser 285 Ser Glu Trp	
gat tgg ttg agg gga gct ttg gcc acc gtt gac aga gac tac gga atc	912
Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg 300 Asp Tyr Gly Ile	
ttg aac aag gtc ttc cac aat atc acg gac acg cac gtg gcg cat cac	960
Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr 315 His Val Ala His His 320	
ctg ttc tcg acc atg ccg cat tat cac gcg atg gaa gct acg aag gcg	1008
Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala 330 Met Glu Ala Thr Lys Ala 335	
ata aag ccg ata ctg gga gag tat tat cag ttc gat ggg acg ccg gtg	1056
Ile Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr 345 Gln Phe Asp Gly Thr Pro Val 350	
gtt aag gcg atg tgg agg gag gcg aag gag tgt atc tat gtg gaa ccg	1104

ES 2 609 697 T3

Val	Lys	Ala	Met	Trp	Arg	Glu	Ala	Lys	Glu	Cys	Ile	Tyr	Val	Glu	Pro	
		355					360					365				
gac	agg	caa	ggt	gag	aag	aaa	ggt	gtg	ttc	tgg	tac	aac	aat	aag	tta	1152
Asp	Arg	Gln	Gly	Glu	Lys	Lys	Gly	Val	Phe	Trp	Tyr	Asn	Asn	Lys	Leu	
	370					375					380					
tga																1155

<210> 4

<211> 384

<212> PRT

5 <213> *Brassica napus*

<400> 4

ES 2 609 697 T3

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

Glu Thr Asp Asn Ile Lys Arg Val Pro Cys Glu Thr Pro Pro Phe Thr
20 25 30

Val Gly Glu Leu Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser
35 40 45

Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Trp Asp Ile Ile Ile Ala Ser
50 55 60

Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Thr Tyr Phe Pro Leu Leu Pro His Pro
65 70 75 80

Leu Ser Tyr Phe Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val
85 90 95

Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser
115 120 125

Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His
130 135 140

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
145 150 155 160

Lys Lys Ser Asp Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu
165 170 175

Gly Arg Thr Val Met Leu Thr Val Gln Phe Thr Leu Gly Trp Pro Leu
180 185 190

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

<210> 5

<211> 1155

<212> ADN

5 <213> *Brassica napus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1155)

<400> 5

ES 2 609 697 T3

atg	ggt	gca	ggt	gga	aga	atg	caa	gtg	tct	cct	ccc	tcc	aag	aag	tct	48
Met	Gly	Ala	Gly	Gly	Arg	Met	Gln	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	Lys	Lys	Ser	
1				5					10					15		

gaa	acc	gac	acc	atc	aag	cgc	gta	ccc	tgc	gag	aca	ccg	ccc	ttc	act	96
Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Lys	Arg	Val	Pro	Cys	Glu	Thr	Pro	Pro	Phe	Thr	

ES 2 609 697 T3

					20						25						30	
gtc	gga	gaa	ctc	aag	aaa	gca	atc	cca	ccg	cac	tgt	ttc	aaa	cgc	tcg	144		
Val	Gly	Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Ile	Pro	Pro	His	Cys	Phe	Lys	Arg	Ser			
		35					40					45						
atc	cct	cgc	tct	ttc	tcc	tac	ctc	atc	tgg	gac	atc	atc	ata	gcc	tcc	192		
Ile	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Tyr	Leu	Ile	Trp	Asp	Ile	Ile	Ile	Ala	Ser			
	50					55					60							
tgc	ttc	tac	tac	gtc	gcc	acc	act	tac	ttc	cct	ctc	ctc	cct	cac	cct	240		
Cys	Phe	Tyr	Tyr	Val	Ala	Thr	Thr	Tyr	Phe	Pro	Leu	Leu	Pro	His	Pro			
65				70					75					80				
ctc	tcc	tac	ttc	gcc	tgg	cct	ctc	tac	tgg	gcc	tgc	caa	ggg	tgc	gtc	288		
Leu	Ser	Tyr	Phe	Ala	Trp	Pro	Leu	Tyr	Trp	Ala	Cys	Gln	Gly	Cys	Val			
				85					90					95				
cta	acc	ggc	gtc	tgg	gtc	ata	gcc	cac	gag	tgc	ggc	cac	cac	gcc	ttc	336		
Leu	Thr	Gly	Val	Trp	Val	Ile	Ala	His	Glu	Cys	Gly	His	His	Ala	Phe			
			100					105					110					
agc	gac	tac	cag	tgg	ttt	gac	gac	acc	gtc	ggt	ctc	atc	ttc	cac	tcc	384		
Ser	Asp	Tyr	Gln	Trp	Phe	Asp	Asp	Thr	Val	Gly	Leu	Ile	Phe	His	Ser			
		115				120						125						
ttc	ctc	ctc	gtc	cct	tac	ttc	tcc	tgg	aag	tac	agt	cat	cga	cgc	cac	432		
Phe	Leu	Leu	Val	Pro	Tyr	Phe	Ser	Trp	Lys	Tyr	Ser	His	Arg	Arg	His			
	130					135					140							
cat	tcc	aac	act	ggc	tcc	ctc	gag	aga	gac	gaa	gtg	ttt	gtc	ccc	aag	480		
His	Ser	Asn	Thr	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Asp	Glu	Val	Phe	Val	Pro	Lys			
145				150					155						160			
aag	aag	tca	gac	atc	aag	tgg	tac	ggc	aag	tac	ctc	aac	aac	cct	ttg	528		
Lys	Lys	Ser	Asp	Ile	Lys	Trp	Tyr	Gly	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asn	Pro	Leu			
				165					170					175				
gga	cgc	acc	gtg	atg	tta	acg	gtt	cag	ttc	act	ctc	ggc	tgg	ccg	ttg	576		
Gly	Arg	Thr	Val	Met	Leu	Thr	Val	Gln	Phe	Thr	Leu	Gly	Trp	Pro	Leu			
			180					185					190					
tac	tta	gcc	ttc	aac	gtc	tcg	gga	aga	cct	tac	gac	ggc	ggc	ttc	gct	624		
Tyr	Leu	Ala	Phe	Asn	Val	Ser	Gly	Arg	Pro	Tyr	Asp	Gly	Gly	Phe	Ala			
		195					200					205						
tgc	cat	ttc	cac	ccc	aac	gct	ccc	atc	tac	aac	gac	cgc	gag	cgf	ctc	672		
Cys	His	Phe	His	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Tyr	Asn	Asp	Arg	Glu	Arg	Leu			
	210					215					220							
cag	ata	tac	atc	tcc	gac	gct	ggc	atc	ctc	gcc	gtc	tgc	tac	ggt	ctc	720		
Gln	Ile	Tyr	Ile	Ser	Asp	Ala	Gly	Ile	Leu	Ala	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu			
225					230					235					240			
ttc	cgf	tac	gcc	gcc	gcg	cag	gga	gtg	gcc	tcg	atg	gtc	tgc	ttc	tac	768		
Phe	Arg	Tyr	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Val	Ala	Ser	Met	Val	Cys	Phe	Tyr			
			245						250					255				
gga	gtc	ccg	ctt	ctg	att	gtc	aat	ggt	ttc	ctc	gtg	ttg	atc	act	tac	816		
Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Asn	Gly	Phe	Leu	Val	Leu	Ile	Thr	Tyr			
			260					265					270					
ttg	cag	cac	acg	cat	cct	tcc	ctg	cct	cac	tac	gat	tcg	tcc	gag	tgg	864		
Leu	Gln	His	Thr	His	Pro	Ser	Leu	Pro	His	Tyr	Asp	Ser	Ser	Glu	Trp			
		275					280					285						

ES 2 609 697 T3

gat	tgg	ttg	agg	gga	gct	ttg	gct	acc	gtt	gac	aga	gac	tac	gga	atc	912
Asp	Trp	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gly	Ile	
	290					295				300						
ttg	aac	aag	gtc	ttc	cac	aat	att	acc	gac	acg	cac	gtg	gcg	cat	cat	960
Leu	Asn	Lys	Val	Phe	His	Asn	Ile	Thr	Asp	Thr	His	Val	Ala	His	His	
	305			310					315						320	
ctg	ttc	tcc	acg	atg	ccg	cat	tat	cac	gcg	atg	gaa	gct	acc	aag	gcg	1008
Leu	Phe	Ser	Thr	Met	Pro	His	Tyr	His	Ala	Met	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	
				325					330					335		
ata	aag	ccg	ata	ctg	gga	gag	tat	tat	cag	ttc	gat	ggg	acg	ccg	gtg	1056
Ile	Lys	Pro	Ile	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Gln	Phe	Asp	Gly	Thr	Pro	Val	
			340				345					350				
gtt	aag	gcg	atg	tgg	agg	gag	gcg	aag	gag	tgt	atc	tat	gtg	gaa	ccg	1104
Val	Lys	Ala	Met	Trp	Arg	Glu	Ala	Lys	Glu	Cys	Ile	Tyr	Val	Glu	Pro	
	355					360					365					
gac	agg	caa	ggt	gag	aag	aaa	ggt	gtg	ttc	tgg	tac	aac	aat	aag	tta	1152
Asp	Arg	Gln	Gly	Glu	Lys	Lys	Gly	Val	Phe	Trp	Tyr	Asn	Asn	Lys	Leu	
	370					375					380					
tga																1155

<210> 6

<211> 384

<212> PRT

5 <213> *Brassica napus*

<400> 6

ES 2 609 697 T3

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Gln Val Ser Pro Pro Ser Lys Lys Ser
 1 5 10 15
 Glu Thr Asp Thr Ile Lys Arg Val Pro Cys Glu Thr Pro Pro Phe Thr
 20 25 30
 Val Gly Glu Leu Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser
 35 40 45
 Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Trp Asp Ile Ile Ile Ala Ser
 50 55 60
 Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Thr Tyr Phe Pro Leu Leu Pro His Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Tyr Phe Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val
 85 90 95
 Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
 100 105 110
 Ser Asp Tyr Gln Trp Phe Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser
 115 120 125

ES 2 609 697 T3

Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His
 130 135 140
 His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
 145 150 155 160
 Lys Lys Ser Asp Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu
 165 170 175
 Gly Arg Thr Val Met Leu Thr Val Gln Phe Thr Leu Gly Trp Pro Leu
 180 185 190
 Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Gly Gly Phe Ala
 195 200 205
 Cys His Phe His Pro Asn Ala Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu
 210 215 220
 Gln Ile Tyr Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu
 225 230 235 240
 Phe Arg Tyr Ala Ala Ala Gln Gly Val Ala Ser Met Val Cys Phe Tyr
 245 250 255
 Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr
 260 265 270
 Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp
 275 280 285
 Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile
 290 295 300
 Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His
 305 310 315 320
 Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala
 325 330 335
 Ile Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Val
 340 345 350
 Val Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro
 355 360 365
 Asp Arg Gln Gly Glu Lys Lys Gly Val Phe Trp Tyr Asn Asn Lys Leu
 370 375 380

<211> 1155

<212> ADN

<213> *Brassica napus*

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1155)

<400> 7

ES 2 609 697 T3

atg Met 1	ggt Gly	gca Ala	ggt Gly	gga Gly 5	aga Arg	atg Met	caa Gln	gtg Val	tct Ser 10	cct Pro	ccc Pro	tcc Ser	aag Lys	aag Lys 15	tct Ser	48
gaa Glu	acc Thr	gac Asp	acc Thr 20	atc Ile	aag Lys	cgc Arg	gta Val	ccc Pro 25	tgc Cys	gag Glu	aca Thr	ccg Pro	ccc Pro 30	ttc Phe	act Thr	96
gtc Val	gga Gly	gaa Glu 35	ctc Leu	aag Lys	aaa Lys	gca Ala	atc Ile 40	cca Pro	ccg Pro	cac His	tgt Cys	ttc Phe 45	aaa Lys	cgc Arg	tcg Ser	144
atc Ile	cct Pro 50	cgc Arg	tct Ser	ttc Phe	tcc Ser	tac Tyr 55	ctc Leu	atc Ile	tgg Trp	gac Asp	atc Ile 60	atc Ile	ata Ile	gcc Ala	tcc Ser	192
tgc Cys 65	ttc Phe	tac Tyr	tac Tyr	gtc Val	gcc Ala 70	acc Thr	act Thr	tac Tyr	ttc Phe	cct Pro 75	ctc Leu	ctc Leu	cct Pro	cac His	cct Pro 80	240
ctc Leu	tcc Ser	tac Tyr	ttc Phe	gcc Ala 85	tgg Trp	cct Pro	ctc Leu	tac Tyr	tgg Trp 90	gcc Ala	tgc Cys	caa Gln	ggg Gly	tgc Cys 95	gtc Val	288
cta Leu	acc Thr	ggc Gly	gtc Val 100	tgg Trp	gtc Val	ata Ile	gcc Ala	cac His 105	gag Glu	tgc Cys	ggc Gly	cac His	cac His 110	gcc Ala	ttc Phe	336
agc Ser	gac Asp	tac Tyr 115	cag Gln	tgg Trp	ctt Leu	gac Asp	gac Asp 120	acc Thr	gtc Val	ggc Gly	ctc Leu	atc Ile 125	ttc Phe	cac His	tcc Ser	384
ttc Phe 130	ctc Leu	ctc Leu	gtc Val	cct Pro	tac Tyr	ttc Phe 135	tcc Ser	tgg Trp	aag Lys	tac Tyr	agt Ser 140	cat His	cga Arg	cgc Arg	cac His	432
cat His 145	tcc Ser	aac Asn	act Thr	ggc Gly 150	tcc Ser	ctc Leu	gag Glu	aga Arg	gac Asp	gaa Glu 155	gtg Val	ttt Phe	gtc Val	ccc Pro	aag Lys 160	480
aag Lys	aag Lys	tca Ser	gac Asp	atc Ile 165	aag Lys	tgg Trp	tac Tyr	ggc Gly	aag Lys 170	tac Tyr	ctc Leu	aac Asn	aac Asn	cct Pro 175	ttg Leu	528
gga Gly	cgc Arg	acc Thr	gtg Val 180	atg Met	tta Leu	acg Thr	ggt Val	cag Gln 185	ttc Phe	act Thr	ctc Leu	ggc Gly	tgg Trp 190	ccg Pro	ttg Leu	576
tac Tyr	tta Leu	gcc Ala 195	ttc Phe	aac Asn	gtc Val	tcg Ser	gga Gly 200	aga Arg	cct Pro	tac Tyr	gac Asp	ggc Gly 205	ggc Gly	ttc Phe	gct Ala	624
tgc Val	cat Leu	ttc Ser	cac Thr	ccc Pro	aac Asn	gct Thr	ccc Pro	atc Ile	tac Tyr	aac Asn	gac Asp	cgc Arg	gag Glu	cgt Thr	ctc Ser	672

ES 2 609 697 T3

Cys	His	Phe	His	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Tyr	Asn	Asp	Arg	Glu	Arg	Leu		
	210					215					220						
cag	ata	tac	atc	tcc	gac	gct	ggc	atc	ctc	gcc	gtc	tgc	tac	ggc	ctc		720
Gln	Ile	Tyr	Ile	Ser	Asp	Ala	Gly	Ile	Leu	Ala	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu		240
225					230					235							
ttc	cgt	tac	gcc	gcc	gcg	cag	gga	gtg	gcc	tgc	atg	gtc	tgc	ttc	tac		768
Phe	Arg	Tyr	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Val	Ala	Ser	Met	Val	Cys	Phe	Tyr		255
			245						250								
gga	gtc	ccg	ctt	ctg	att	gtc	aat	ggc	ttc	ctc	gtg	ttg	atc	act	tac		816
Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Asn	Gly	Phe	Leu	Val	Leu	Ile	Thr	Tyr		270
			260					265									
ttg	cag	cac	acg	cat	cct	tcc	ctg	cct	cac	tac	gat	tgc	tcc	gag	tgg		864
Leu	Gln	His	Thr	His	Pro	Ser	Leu	Pro	His	Tyr	Asp	Ser	Ser	Glu	Trp		285
		275					280										
gat	tgg	ttg	agg	gga	gct	ttg	gct	acc	gtt	gac	aga	gac	tac	gga	atc		912
Asp	Trp	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gly	Ile		290
						295					300						
ttg	aac	aag	gtc	ttc	cac	aat	att	acc	gac	acg	cac	gtg	gcg	cat	cat		960
Leu	Asn	Lys	Val	Phe	His	Asn	Ile	Thr	Asp	Thr	His	Val	Ala	His	His		305
					310					315							320
ctg	ttc	tcc	acg	atg	ccg	cat	tat	cac	gcg	atg	gaa	gct	acc	aag	gcg		1008
Leu	Phe	Ser	Thr	Met	Pro	His	Tyr	His	Ala	Met	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala		325
				325					330					335			
ata	aag	ccg	ata	ctg	gga	gag	tat	tat	cag	ttc	gat	ggg	acg	ccg	gtg		1056
Ile	Lys	Pro	Ile	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Gln	Phe	Asp	Gly	Thr	Pro	Val		340
			340					345					350				
ggt	aag	gcg	atg	tgg	agg	gag	gcg	aag	gag	tgt	atc	tat	gtg	gaa	ccg		1104
Val	Lys	Ala	Met	Trp	Arg	Glu	Ala	Lys	Glu	Cys	Ile	Tyr	Val	Glu	Pro		355
		355				360						365					
gac	agg	caa	ggt	gag	aag	aaa	ggt	gtg	ttc	tgg	tac	aac	aat	aag	tta		1152
Asp	Arg	Gln	Gly	Glu	Lys	Lys	Gly	Val	Phe	Trp	Tyr	Asn	Asn	Lys	Leu		370
						375					380						
tga																	1155

<210> 8

<211> 384

<212> PRT

5 <213> *Brassica napus*

<400> 8

Met	Gly	Ala	Gly	Gly	Arg	Met	Gln	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	Lys	Lys	Ser		
1				5					10					15			
Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Lys	Arg	Val	Pro	Cys	Glu	Thr	Pro	Pro	Phe	Thr		
			20					25					30				
Val	Gly	Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Ile	Pro	Pro	His	Cys	Phe	Lys	Arg	Ser		
		35					40					45					

Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Trp Asp Ile Ile Ile Ala Ser
50 55 60

Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Thr Tyr Phe Pro Leu Leu Pro His Pro
65 70 75 80

Leu Ser Tyr Phe Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val
85 90 95

Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser
115 120 125

Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His
130 135 140

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
145 150 155 160

Lys Lys Ser Asp Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu
165 170 175

Gly Arg Thr Val Met Leu Thr Val Gln Phe Thr Leu Gly Trp Pro Leu
180 185 190

Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Gly Gly Phe Ala
195 200 205

Cys His Phe His Pro Asn Ala Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu
210 215 220

Gln Ile Tyr Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu
225 230 235 240

Phe Arg Tyr Ala Ala Ala Gln Gly Val Ala Ser Met Val Cys Phe Tyr
245 250 255

Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr
260 265 270

Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp
275 280 285

Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile
290 295 300

Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His

ES 2 609 697 T3

305					310					315					320
Leu	Phe	Ser	Thr	Met	Pro	His	Tyr	His	Ala	Met	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala
				325					330					335	
Ile	Lys	Pro	Ile	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Gln	Phe	Asp	Gly	Thr	Pro	Val
			340					345					350		
Val	Lys	Ala	Met	Trp	Arg	Glu	Ala	Lys	Glu	Cys	Ile	Tyr	Val	Glu	Pro
		355					360					365			
Asp	Arg	Gln	Gly	Glu	Lys	Lys	Gly	Val	Phe	Trp	Tyr	Asn	Asn	Lys	Leu
	370					375					380				

<210> 9

<211> 1561

<212> ADN

5 <213> *Brassica napus*

<400> 9

ES 2 609 697 T3

gagaaccaga gagattcatt accaaagaga tagagagaga gagaaagaga ggagacagag	60
agagagtttg aggaggagct tcttcgtagg gttcatcggt attaacgtta aatcttcatc	120
ccccctacg tcagccagct caagaaacat ggggtgcaggt ggaagaatgc aagtgtctcc	180
tccctccaaa aagtctgaaa ccgacaacat caagcgcgta ccctgcgaga caccgcccctt	240
cactgtcggga gaactcaaga aagcaatccc accgcactgt ttcaaacgct cgatcccctcg	300
ctctttctcc tacctcatct gggacatcat catagcctcc tgcttctact acgtcgccac	360
cacttacttc cctctcctcc ctcaccctct ctctacttc gcctggcctc tctactgggc	420
ctgccagggc tgcgtcctaa ccggcgtctg ggtcatagcc cacgagtgcg gccaccacgc	480
cttcagcgac taccagtggc tggacgacac cgtcggcctc atcttccact ctttctctct	540
cgtccccttac ttctcctgga agtacagtca tcgacgccac cattccaaca ctggctccct	600
cgagagagac gaagtgtttg tcccaagaa gaagtcagac atcaagtggg acggcaagta	660
cctcaacaac cctttgggac gcaccgtgat gttaacgggt cagttcactc tcggctggcc	720
tttgtactta gccttcaacg tctcggggag acctacgac ggcggcttcg cttgccattt	780
ccaccccaac gctcccctct acaacgaccg tgagcgtctc cagatataca tctccgacgc	840
tggcatcctc gccgtctgct acggctcteta ccgctacgct gctgtccaag gagttgcctc	900
gatggtctgc ttctacggag ttctcttct gattgtcaac gggttcttag ttttgatcac	960
ttacttgcag cacacgcatc cttccctgcc tcaactatgac tcgtctgagt gggattgggt	1020
gaggggagct ttggccaccg ttgacagaga ctacggaatc ttgaacaagg tcttccacaa	1080
tatcacggac acgcacgtgg cgcatacct gttctcgacc atgccgcatt atcatgcat	1140
ggaagctacg aaggcgataa agccgatact gggagagtat tatcagttcg atgggacgcc	1200
ggtggttaag gcgatgtgga gggaggcgaa ggagtgtatc tatgtggaac cggacaggca	1260
aggtgagaag aaaggtgtgt tctggtacaa caataagtta tgaagcaaag aagaaactga	1320
acctttctcw tcctatgatt gtctttgttt aagaagctat gtttctgttt caataatctt	1380
taattatcca ttttgttggtg ttttctgaca ttttggctaa aattatgtga tgttgggaag	1440
tagtgtctaa aatgtcttgt gtctgtattg ttcttcttct catcgctgtt atgtttggga	1500
tcgttgaaat gtgactttcg gactagtgaa ctcttgttct cgaactaaaa aaaaaaaaaa	1560
a	1561

<210> 10

<211> 1553

5 <212> ADN

<213> *Brassica napus*

<400> 10

ES 2 609 697 T3

gagacagatt cattaccaa gagatagaga aagagagaga gagagagaga gagagagagt 60
gagtttgagg aggagcttct tcgtaggggt catcgttatt aacgttaaatt cttcaccccc 120
tacgtcagcc agctcaagaa acatgggtgc aggtggaaga atgcaagtgt ctctccctc 180
caagaagtct gaaaccgaca ccatcaagcg cgtaccctgc gagacaccgc cttcactgt 240
cggagaactc aagaaagcaa tcccaccgca ctgtttcaaa cgctcgatcc ctgctctttt 300
ctctacctc atctgggaca tcatcatagc ctctgcttc tactacgtcg ccaccactta 360
cttccctctc ctccctcacc ctctctccta ctctgcttg cctctctact gggcctgcc 420
agggtgctc ctaaccggcg tctgggtcat agcccacgag tgcggccacc acgccttcag 480
cgactaccag tggcttgacg acaccgtcgg tctcatcttc cactccttcc tctcgtccc 540
ttacttctcc tggaggtaca gtcatcgacg ccaccattcc aacctggct ccctcgagag 600
agacgaagtg tttgtcccca agaagaagtc agacatcaag tggtagcggca agtacctcaa 660
caaccctttg ggacgcaccg tgatgttaac ggttcagttc actctcggct ggcctgtgta 720
cttagccttc aacgtctcgg gaagacctta cgacggcggc ttcgcttgcc atttccacc 780
caacgtccc atctacaacg accgcgagcg tctccagata tacatctccg acgctggcat 840
cctcggctc tgctacggtc tcttccgtta cgccgccgss cagggagtgg cctcgatggt 900
ctgcttctac ggagtcccgc tctgattgt caatggtttc ctctgttga tcaactactt 960
gcagcacacg catccttccc tgctcacta cgattcgtcc gagtgggatt ggttsagggg 1020
agctttggct accgttgaca gagactacgg aatcttgaac aaggcttcc acaatattac 1080
cgacacgcac gtggcscatc atcygttctc cacgatgccg cattatcacg cgatggaagc 1140
taccaaggcg ataaagccga tactgggaga gtattatcag ttcgatggga cgccggtggt 1200
taaggcgatg tggagggagg cgaaggagt tatctatgtg gaaccggaca ggcaagggtga 1260
gaagaaaggt gtgttctggt acaacaataa gttatgagga trraagaaac tgaacctttc 1320

tcttctatg attgtctttg tttagaagc tatgtttctg tttcaataat ctttaattatc 1380
cattttgttg tgttttctga cattttggct aaaattatgt gatgttgga gttagtgtct 1440
aaaatgtctt gtgtctgtat tgttcttctt ctcatcgtg ttatgtttgg gatcgttgaa 1500
atgtgacttt cggactagtg aactcttgtt ctgcaactaa aaaaaaaaaa aaa 1553

<210> 11

<211> 2614

<212> ADN

5 <213> *Brassica napus*

<400> 11

ES 2 609 697 T3

agagagagaa gagaggagac agagagagag tttgaggagg agcttcttcg tagggttcat 60
 cgttattaac gttaaatctt catcccccc tacgtcagcc agctcaaggt ccctttcttc 120
 ttccatttct tctcattttt acgttgtttt caatcttggc ctgttctttt cttatcgctt 180
 ttctgttcta tctatcattt ttgcatttca gtcgatttat ttctagatct gttaatattt 240
 attgcattaa actatagatc tggcttggat tctctgtttt catgtgtgaa atcttggatgc 300
 tgtcttaacc attaatctga ttatattgtc tataccgtgg agaatatgaa atgttgcatt 360
 ttcatthtgc cgaatacaaa ctgtttgact ttcaatcggt tttaaaatta tatatatatt 420
 tttgatgggt tgggtggagt gaaaaatcac catagcagtc tcacgtcctg gtcttagaaa 480
 tatccttctt attcaaagtt atatatattt gttactttt gtttttagatc tggacctgag 540
 acatgtaagt acatatttgt tgaatcttgg ggtaaaaaac ttatgtctct gggtaaaaatt 600
 tgctgagaga tttgaccgat tcctattggc tctggattct gtagttacct aatacatgaa 660
 aaagtttcat ttggcctatg ctcaacttcat gcttataaac tttttcttgc aaattaattg 720
 gattagatgc tccttcatag attcagatgc aatagatttg catgaagaaa ataataggat 780
 tcatgatagt aaaaaagatt gtatttttgt ttgtttgttt atgtttaaaa gtctatatgt 840
 tgacaataga gttgctatca actgttttcat ttaggtttat gtttttgcga agttgcttat 900
 tctaagagac attgtgatta tgacttgtct tctctaactg agtttagtaa taaaagacga 960
 aagaaattga tatccacaag aaagagatgt aagctgtaac gtatcaaatac tcattaataa 1020
 ctagtagtat tctcaacgct atcgtttatt tctttcttgg gtttgccact atatgccgct 1080
 tctctgctct tttatcccac gtactatcca tttttttgtt ggtagtccat ttttttgaaa 1140
 ctttaataac gtaacactga atattaattt gttggtttaa ttaactttga gtctttgctt 1200
 ttggtttatg cagaaacatg ggtgcaggtg gaagaatgca agtgtctcct ccctcaaaaa 1260
 agtctgaaac cgacaacatc aagcgcgtac cctgcgagac accgcccttc actgtcggag 1320
 aactcaagaa agcaatccca ccgcactggt tcaaacgctc gatccctcgc tctttctcct 1380
 acctcatctg ggacatcatc atagcctcct gcttctacta cgtcgccacc acttacttcc 1440
 ctctctctcc tcaccctctc tctacttctg cctggcctct ctactgggcc tgccagggct 1500

ES 2 609 697 T3

gcgtcctaac cggcgtctgg gtcatagcc acgagtgcga ccaccacgcc ttcagcgact 1560
accagtggct ggacgacacc gtcggcctca tcttccactc cttcctcctc gtccttact 1620
tctcctggaa gtacagtcac cgacgccacc attccaacac tggctccctc gagagagacg 1680
aagtgtttgt cccaagaag aagtcagaca tcaagtggta cggcaagtac ctcaacaacc 1740
ctttgggacg caccgtgatg ttaacggttc agttcactct cggctggcct ttgtacttag 1800
ccttcaacgt ctcggggaga ccttacgacg gcggcttcgc ttgccatttc caccccaacg 1860
ctcccatcta caacgaccgt gagcgtctcc agatatacat ctccgacgct ggcacctcgc 1920
ccgtctgcta cggctctctac cgtacgctg ctgtccaagg agttgcctcg atggctctgct 1980
tctacggagt tcctcttctg attgtcaacg ggttcttagt tttgatcact tacttgcagc 2040
acacgcaccc ttccctgcct cactatgact cgtctgagtg ggattgggtg aggggagctt 2100
tggccaccgt tgacagagac tacggaatct tgaacaaggc cttccacaat atcacggaca 2160
cgcacgtggc gcatcacctg ttctcgacca tgccgcatta tcacgcgatg gaagctacga 2220
aggcgataaa gccgatactg ggagagtatt atcagttcga tgggacgccg gtgggttaagg 2280
cgatgtggag ggaggcgaag gagtgtatct atgtggaacc ggacaggcaa ggtgagaaga 2340
aagggtgtgt ctggtacaac aataagttat gaagcaaaga agaaactgaa cttttctcat 2400
ctatgattgt ctttgtttta agaagctatg tttctgtttc aataatcttt aattatccat 2460
tttgttgtgt tttctgacat tttggctaaa attatgtgat gttggaagtt agtgtctaaa 2520
atgtcttgtg tctgtattgt tcttcttctc atcgtgttta tgtttgggat cgttgaaatg 2580
tgactttcgg actagtgaat cttgttctcg aact 2614

<210> 12

<211> 2666

<212> ADN

5 <213> *Brassica napus*

<400> 12

ES 2 609 697 T3

gagaagagag agagagagag agagagagag agtgagtttg aggaggagct tcttcgtagg	60
gttcatcgtt attaacgtta aatcttcacc ccctacgtca gccagctcaa ggtccctttc	120
ttcttccatt tcttttcatt ctacgttggt ttcaatctta tgaaactttc tggctctgtgc	180
ttttcttata gcttttctat tctatctatc atttttgcat ttcagtcgat ttaattctag	240
atctgttaat attaaactat agatctgttc ttgattctct gttttcatgt gtgaaatctg	300
atgctgtatt aatctgatta tattgtctat accgtggaga atatcaaag ttgcattttc	360
atgtgcccga atacaaagtg tttgactttc aatcgttttt aattatatat atatatatat	420
tttttgatgg gttggtggag ttgaaaaatc accatagcag tctcacgtcc tggttttaga	480
aatatcctat tcaaaattat atatttgttt acttgtrtta gatctggacc tgagacatat	540
aagtacctat ttgttgaatc tttgggtaaa aacttatgtc tctgggtaaa atttgctggg	600

ES 2 609 697 T3

agatttgacc gattcctatt ggctcttgat tctgtagtta cgtaatacat gaaaaagttt 660
 catttggcct atgctcactt catgcttata aacgttttct tgcaaattaa ttggattaga 720
 tgttatttca tagattcagt cattcagata caatggagtt gcatgaagaa aataatagaa 780
 ttcgtgacag taaaaaagat tgtatttttg tttgtttggt tatgtttaaa agtctatatg 840
 ttgacaatag agttgctctc aactgtttca tttagcttct ttttttgca agttgcttat 900
 tcttagagac attgtgatta tgacttgtct tctttaacgt agtttagtaa taaaagacga 960
 aagaaattga tatccacaag aaagagatgt gagctgtagc gtatcaaac tcgttcattt 1020
 actagtagta ttctcaacgc tatcgtttat ttatttttct ttcgttggtt tgccactata 1080
 tgccacttct ctctcttttg tcccacgtac tatccatttt ttttggtgta gtccattttc 1140
 ttgtaactta taataacgta actctgaatc ttttgtctgt agattaattt gttggtttaa 1200
 ttaactttta agtctttgct tttggcttat gcagaaacat ggggtgcaggt ggaagaatgc 1260
 aagtgtctcc tccctccaag aagtctgaaa ccgacacat caagcgcgta ccctgcgaga 1320
 caccgccctt cactgtcgga gaactcaaga aagcaatccc accgactgt tcaaacgct 1380
 cgatccctcg ctctttctcc tacctcatct gggacatcat catagcctcc tgcttctact 1440
 acgtgccac cacttacttc cctctctcc ctcaccctct ctctacttc gcctggcctc 1500
 tctactgggc ctgccaaggg tgcgtcctaa ccggcgtctg ggtcatagcc cacgagtgcg 1560
 gccaccacgc cttcagcgac taccagtggg ttgacgacac cgtcggctc atcttccact 1620
 ccttctctct cgtcccttac ttctctgga agtacagtca tcgacgccac cattccaaca 1680
 ctggctccct cgagagagac gaagtgttg tcccaagaa gaagtcagac atcaagtggg 1740
 acggcaagta cctcaacaac cttttgggac gcaccgtgat gttaacggtt cagttcactc 1800
 tcggctggcc gttgtactta gccttcaacg tctcgggaag accttacgac ggcggcttcg 1860
 cttgccattt ccacccaac gctccatct acaacgaccg cgagcgtctc cagatataca 1920
 tctccgacgc tggcatctc gccgtctgt acggtctctt ccgttacgcc gccgcgagg 1980
 gagtggcctc gatggctctg tctacggag tcccgttct gattgtcaat ggtttctcg 2040
 tgttgatcac ttacttgcag cacacgcatc ctccctgcc tcaactacgat tcgtccgagt 2100
 gggattgggt gaggggagct ttggctaccg ttgacagaga ctacggaatc ttgaacaagg 2160
 tcttccacaa tattaccgac acgcacgtgg cgcacatct gttctccacg atgccgatt 2220
 atcacgcgat ggaagctacc aaggcgataa agccgatact gggagagtat tatcagttcg 2280
 atgggacgcc ggtgggtaag gcgatgtgga gggaggcgaa ggagtgtatc tatgtggaac 2340
 cggacaggca aggtgagaag aaaggtgtgt tctggtacaa caataagtta tgaggatatg 2400
 atgatggtga aagaacaaag aagatattgt cacgaacctt tctcttgctg tctctggctg 2460
 tctttgtttt aagaagctat gttttcgttt caataatctt aactatccat tttgtrtgtg 2520
 tttctgacat tttggctaaa attatgtgat gttggaagtt agtgtctaaa atgtcttgtg 2580

ES 2 609 697 T3

tctgtattgt tcttcttctc atcgctgta tgtttgggat cgttgaaatg tgactttcgg . 2640
actagtgaac tcttggttct cgaact . 2666

Reivindicaciones

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína delta-12 desaturasa (FAD2), teniendo dicha proteína FAD2 una sustitución de aminoácidos en la posición 108 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre, en donde la dicha proteína FAD2 de tipo silvestre está representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4 u 8, y en donde dicho aminoácido en la posición 108 se cambia a un ácido Aspártico.
2. Una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde dicha proteína FAD2 es una proteína FAD2 de Brassica, más particularmente una proteína FAD2 de *Brassica napus*.
- 10 3. Una molécula de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico de SEQ ID NO 1, u 11, su forma complementaria o forma de ARN.
- 15 4. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90 e incluso más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO 1 u 11, o con la forma complementaria o la forma de ARN del mismo, que codifican una proteína FAD2 que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 108 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre, en donde dicha proteína FAD2 de tipo silvestre está representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4 u 8, y en donde dicho aminoácido en la posición 108 se cambia a un ácido Aspártico.
- 20 5. Un fragmento de al menos 20 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicho fragmento el codón mutado que corresponde a dicha sustitución de aminoácidos en la posición 108.
- 25 6. Una proteína FAD2 que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 108, o que corresponde a la posición 108, con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre tal como la proteína FAD2 de tipo silvestre representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 4 u 8 y en donde dicho aminoácido en la posición 108 se cambia a un ácido Aspártico.
7. Una proteína FAD2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2.
8. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Una célula huésped que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un vector de acuerdo con la reivindicación 8.
- 30 10. La célula huésped de la reivindicación 9 que comprende además una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína delta-12 oleato desaturasa (FAD2), teniendo dicha proteína FAD2 una sustitución de aminoácidos en la posición 118 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre, en donde la dicha proteína FAD2 de tipo silvestre está representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4 u 8, y en donde dicho aminoácido en la posición 118 es una fenilalanina.
- 35 11. Una planta transformada de forma estable con un vector de la reivindicación 8.
12. Una planta de la reivindicación 11, en donde dicha planta que se va a transformar se selecciona del grupo que consiste de cultivos productores de aceite.
13. Una planta de la reivindicación 12, en donde dichos cultivos productores de aceite son de girasoles, soja, algodón, maíz y/o semilla de colza.
- 40 14. Una semilla derivada de una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 y que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un vector de acuerdo con la reivindicación 8.
- 45 15. Progenie derivada de una planta o una parte de planta o una semilla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 y que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un vector de acuerdo con la reivindicación 9.
16. Un método para potenciar el contenido de ácido oleico en una planta que comprende transformar una planta con el vector de la reivindicación 8.
17. Utilización de fragmentos de al menos 20 nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 5 como cebadores, sondas y/o marcadores seleccionables.

18. Un método de selección asistida por marcadores de plantas de especies *Brassica* usando una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
19. Un kit de ensayo que comprende un primer recipiente que contiene una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 5 20. El kit de ensayo de la reivindicación 19 que comprende además un fragmento de al menos 20 nucleótidos de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína FAD2, teniendo dicha proteína FAD2 una sustitución de aminoácidos en la posición 118 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre, comprendiendo dicho fragmento el codón mutado que corresponde a dicha sustitución de aminoácidos en la posición 118, en donde dicha proteína FAD2 de tipo silvestre está representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4 u 8 y en donde dicho aminoácido en la posición 118 es una fenilalanina.
- 10 21. Un método para producir líneas de plantas con alto contenido oleico que comprende:
- (a) inducir mutagénesis en al menos algunas células de una planta, más particularmente de una planta de Brassica y preferiblemente de una planta de *Brassica napus* que tiene un contenido de ácido oleico inferior al 70%;
- (b) regenerar plantas a partir de al menos una de dichas células mutagenizadas; y
- 15 (c) seleccionar plantas regeneradas que tienen una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y/o que expresa una proteína FAD2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8.
22. El método de la reivindicación 21, que comprende además la etapa de seleccionar plantas regeneradas que tienen una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína delta-12 oleato desaturasa (FAD2), teniendo dicha proteína FAD2 una sustitución de aminoácidos en la posición 118 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre, en donde la dicha proteína FAD2 de tipo silvestre está representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4 u 8, y en donde dicho aminoácido en la posición 118 es una fenilalanina.
- 20 23. Una planta que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína FAD2 que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 108 con respecto a una proteína FAD2 de tipo silvestre, en donde dicha proteína FAD2 de tipo silvestre está representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4 u 8, y en donde dicho aminoácido en la posición 108 se cambia a un ácido Aspártico.
- 25 24. La planta de la reivindicación 23, en donde la proteína FAD2 comprende SEQ ID NO 2.
25. La planta de la reivindicación 24 que codifica además una segunda proteína FAD2 que comprende SEQ ID NO 6.

