

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 131**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/10 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2014 PCT/EP2014/057770**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14170387**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2014 E 14721239 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2986727**

54 Título: **Plantas de Brassica híbridas y métodos para producir las mismas**

30 Prioridad:

19.04.2013 EP 13164421

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

18.12.2018

73 Titular/es:

BAYER CROPSCIENCE NV (100.0%)

J.E. Mommaertslaan 14

1831 Diegem, BE

72 Inventor/es:

ROUAN, DOMINIQUE y

DE BOTH, GRETA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 694 131 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas de *Brassica* híbridas y métodos para producir las mismas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a plantas, material vegetal y semillas de *Brassica* transgénica, en particular a plantas de colza oleaginosa, caracterizadas porque estas plantas albergan una combinación de dos eventos de transformación específicos, en particular por la presencia de un gen de esterilidad masculina, en una ubicación específica en el genoma de *Brassica* y un gen de restablecimiento de la fertilidad en otra ubicación específica en el genoma de *Brassica*. La invención también se refiere a una pareja de plantas de *Brassica* transgénica, en particular plantas de colza oleaginosa, que son particularmente adecuadas para la producción de semillas híbridas. Más específicamente, una de las plantas se caracteriza por ser estéril-masculina, debido a la presencia en su genoma de un gen de esterilidad masculina, mientras que la otra se caracteriza por tener un gen restablecedor de la fertilidad, capaz de evitar la actividad del gen de esterilidad masculina. La pareja de plantas de *Brassica* de la invención combina la capacidad de formar semillas híbridas con un rendimiento agronómico global óptimo, estabilidad genética y adaptabilidad a diferentes acervos genéticos.

15 Antecedentes de la invención

La expresión fenotípica de un transgén en una planta está determinada tanto por la estructura del propio gen como por su ubicación en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia del transgén (en un ADN extraño) en diferentes ubicaciones en el genoma influirá en el fenotipo global de la planta de diferentes maneras. La introducción satisfactoria desde el punto de vista agronómico o industrial de un rasgo comercialmente interesante en una planta mediante manipulación genética puede ser un procedimiento largo que depende de diferentes factores. La transformación y regeneración reales de plantas transformadas genéticamente son solo las primeras de una serie de etapas de selección que incluyen la caracterización genética exhaustiva, la reproducción y la evaluación en ensayos de campo.

25 El término "colza" incluye todas las semillas de la especie *Brassica*. *Brassica* se cultiva desde China e India hasta Finlandia y Canadá como uno de los cultivos de aceite más valiosos. La mayoría de los tipos de *Brassica* pertenecen a la familia de las crucíferas. Se originaron como una especie diploide que tiene un número de cromosomas aneuploides que varía de 7 (*Brassica fruticulosa*) a 12 (*Sinapis alba*). La especie de *Brassica* más cultivada en Canadá se conoce como nabina o *Brassica campestris* (aa, n = 10). *Brassica oleracea* (cc, n = 9) se ha diversificado en la historia evolutiva reciente en al menos seis tipos hortícolas principales, incluyendo el brócoli, la coliflor y el repollo. La *Brassica nigra* (bb, n = 8) o mostaza negra es un cultivo menos importante comercialmente y es conocida principalmente por sus semillas de las que se hizo originariamente la mostaza. De estos tipos básicos, han derivado híbridos anfiploides en etapas evolutivas más recientes por entrecruzamiento. De éstos, los más importantes son *Brassica napus* (aacc), del cual los tipos de invierno proporcionan los rendimientos de colza más altos en el norte de Europa y *Brassica juncea* (aabb) o mostaza parda, que es uno de los principales cultivos de aceite del subcontinente indio. Aunque el entrecruzamiento entre diferentes especies de *Brassica* (en particular aquellas con genomas compatibles) es posible y con frecuencia se hace con fines de reproducción, no todos los rasgos (o genes) serán susceptibles de transferirse de una especie a la otra ni, cuando se transfieran a una especie diferente, conservarán características idénticas (o patrones de expresión). Por tanto, un locus genético que confiere la expresión óptima de un gen natural o quimérico en una especie de *Brassica*, no necesariamente tendrá el mismo efecto en otra.

40 Las especies de *Brassica* son bisexuales y normalmente el 60-70 % se autopolinizan. La producción de híbridos y la introducción de la variación genética como base para la selección dependían tradicionalmente de la adaptación de fenómenos de origen natural tales como la autoincompatibilidad y la esterilidad masculina citoplásmica. No se aplican ampliamente en la reproducción de *Brassica* métodos de control de la polinización artificial, tales como la emasculación manual o el uso de gametocidas, debido a su practicabilidad limitada y alto coste, respectivamente.

45 Se han desarrollado métodos transgénicos para la producción de plantas masculinas o estériles-femeninas, que proporcionan alternativas interesantes a las técnicas tradicionales.

El documento EP 0.344.029 describe un sistema para obtener esterilidad masculina nuclear por el que las plantas se transforman con un gen de esterilidad masculina, que comprende, por ejemplo, un ADN que codifica una molécula de barnasa bajo el control de un promotor TA29 específico del tapete, que cuando se incorpora en una planta garantiza una destrucción selectiva de las células del tapete. La transformación de plantas de tabaco y colza oleaginosa con un gen de este tipo dio como resultado plantas en las que se evitó completamente la formación de polen (Mariani et al. 1990, *Nature* 347: 737-741).

De Block y De Brouwer (1993, *Planta* 189: 218-225) describen el análisis citoquímico e histoquímico del desarrollo de antera de plantas de *Brassica napus* que comprenden el gen quimérico PTA29:barnasa.

5 Para restablecer la fertilidad en la progenie de una planta estéril-masculina, se desarrolló un sistema por el que la planta estéril-masculina se cruza con una planta transgénica que lleva un gen restablecedor de la fertilidad, que cuando se expresa es capaz de inhibir o evitar la actividad del gen de esterilidad masculina (documento US 5.689.041; documento US 5.792.929; De Block y De Brouwer, citado anteriormente). El uso de genes correguladores en la producción de plantas estériles-masculinas para aumentar la frecuencia de transformantes que tengan un buen rendimiento agronómico se describe en el documento WO 96/26283. Normalmente, cuando el ADN de esterilidad codifica una barnasa, el ADN corregulador codificará una barstar.

10 Se ha descrito exhaustivamente el Evento de Élite MS-B2 y plantas estériles-masculinas que comprenden este evento de élite que confiere esterilidad masculina en el documento WO01/31042, incluyendo la caracterización del transgén y de las secuencias de ADN de la planta que flanquean inmediatamente el transgén insertado.

La semilla de referencia que comprende el evento de élite MS-B2 se depositó en la ATCC (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) el 14 de octubre de 1999, con el número de acceso de la ATCC PTA-850. Otra muestra de la misma semilla se depositó con el número de acceso PTA-2485. Un nombre alternativo para MS-B2 es MS 11.

15 Se ha descrito exhaustivamente el Evento de Élite RF-BN1 y plantas que comprenden este evento de élite que confiere esterilidad masculina en el documento WO01/41558, incluyendo la caracterización del transgén y de las secuencias de ADN de la planta que flanquean inmediatamente el transgén insertado.

La semilla de referencia que comprende el evento de élite RF-BN1 se depositó en la ATCC (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) el 20 de septiembre de 1999, con el número de acceso de la ATCC PTA-730. Un nombre alternativo para RF-BN1 es Rf 3.

20 El documento WO01/41558 también describe el evento de élite MS-BN1, plantas estériles masculinas que comprenden el evento, así como métodos para identificar dichas plantas y la progenie de las mismas. Un nombre alternativo para MS-BN1 es MS 8.

Los eventos MS-BN1 y RF-BN1 están comprendidos en plantas híbridas de *B. napus* que se comercializan con el nombre comercial In Vigor® Canola.

25 Estos documentos mencionados anteriormente no describen la combinación particular MS-B2 y RF-BN1 en plantas de *Brassica* ni el uso de la misma en la producción de semillas híbridas. Tampoco se ha descrito hasta ahora RF-BN1 en *Brassica juncea*, así como tampoco el uso de MS-B2 para aumentar el rendimiento de plantas de semillas oleaginosas de *Brassica*.

Sumario de la invención

30 En una realización, la invención proporciona una planta de colza oleaginosa, que es una planta de *Brassica napus* o *Brassica juncea*, que comprende en su genoma nuclear al menos una copia del evento de élite MS-B2, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA 2485 o ATCC_PTA-850 y al menos una copia del evento de élite RF-BN1, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA-730.
35 También se proporcionan células o tejidos o semillas de dichas plantas de colza oleaginosa.

También se proporciona una célula o tejido o semilla de la planta de colza oleaginosa de acuerdo con la invención que comprende en su genoma nuclear al menos una copia del evento de élite MS-B2 y al menos una copia del evento de élite RF-BN1.

40 En otra realización más de la invención, se proporciona una pareja de plantas de colza oleaginosa, consistiendo dicha pareja en dos plantas de colza oleaginosa en combinación, adecuada para su uso en la producción de semillas híbridas mediante cruce entre sí, en la que una de las plantas de colza oleaginosa es una planta de colza oleaginosa hembra estéril-masculina que comprende el evento de élite MS-B2 que comprende un gen de esterilidad masculina, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA 2485 o ATCC_PTA-850, y siendo la otra de dichas plantas de colza oleaginosa una
45 planta de colza oleaginosa fértil-masculina que comprende el evento de élite RF-BN1 que comprende un gen de restablecimiento de la fertilidad, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA-730, en la que la planta que comprende el evento de élite RF-BN1 tiene la capacidad de restablecer la fertilidad en plantas que comprenden el evento de élite MS-B2.

50 También es un objeto de la invención proporcionar ADN genómico de una planta de colza oleaginosa, que es la planta de *Brassica napus* o *Brassica juncea*, que comprende en su genoma nuclear al menos una copia del evento de élite elite MS-B2, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA 2485 o ATCC_PTA850 y al menos una copia del evento de élite RF-BN1,

estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA-730.

5 La invención también proporciona *Brassica juncea*, así como células y semillas de la misma, que comprenden el evento de élite RF-BN1, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA730. Dichas plantas pueden comprender adicionalmente el evento de élite MS-B2, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA 2485 o ATCC_PTA-850.

10 Se describe adicionalmente el uso del evento de élite MS-B2, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA 2485 o ATCC_PTA-850 para aumentar el rendimiento de semillas en una planta de colza oleaginosa transgénica tal como una planta de *Brassica juncea*.

15 También se describe un método para aumentar el rendimiento en plantas de colza oleaginosa que comprende la etapa de proporcionar a la planta de colza oleaginosa un evento de élite MS-B2, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA 2485 o ATCC_PTA-850.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Comparación del vigor, después de la aplicación, de herbicidas de estirpes de *B. napus* híbrida MS/RF. Panel A: sin aplicación de glufosinato de amonio. Panel B: una aplicación de glufosinato de amonio. Panel C: dos aplicaciones de glufosinato de amonio. Cuadrados: plantas MS-BN1/RF-BN1; Puntos: plantas MS-B2/RF-BN1.

20 Figura 2: Comparación del rendimiento, después de la aplicación de herbicidas, de estirpes de *B. napus* híbridas MS/RF. Panel A: sin aplicación de glufosinato de amonio. Panel B: una aplicación de glufosinato de amonio. Panel C: dos aplicaciones de glufosinato de amonio. Barras de color gris oscuro: plantas MS-BN1/RF-BN1; Barras de color gris claro: plantas MS-B2/RF-BN1. Loci a Loc5: ubicaciones de ensayo de campo; PROM: promedio en todas las ubicaciones. El rendimiento se presenta como % en comparación con plantas MS-BN1/RF-BN1 establecidas como el 100 %.

25

Descripción detallada

La presente invención describe una nueva combinación de un evento de esterilidad masculina MS-B2 y un evento de restablecimiento de la fertilidad RF-BN1 en plantas de colza oleaginosa, en particular *Brassica napus* y *Brassica juncea*.

30 La presente invención se basa, entre otras cosas, en el hallazgo inesperado de que el evento de élite RF-BN1 que confiere restablecimiento de la fertilidad es suficientemente eficaz en las plantas de colza oleaginosa *Brassica* para restablecer la fertilidad cuando la planta también contiene adicionalmente el evento de élite MS-B2 que confiere esterilidad masculina. Aunque RF-BN1 se ha utilizado anteriormente satisfactoriamente para restablecer la fertilidad en plantas de colza oleaginosa, que comprendían el evento de élite MS-BN1, era impredecible si RF-BN1 también
35 podría usarse para restablecer la fertilidad en plantas de colza oleaginosa que comprendieran el evento de élite MS-B2. Los diferentes eventos de élite que comprenden esterilidad masculina tienen diferentes niveles de expresión del producto barnasa expresado por el gen de esterilidad masculina transgénico y no puede predecirse que los niveles de inhibidor de la barnasa, barstar, producidos por el gen de restablecimiento de la fertilidad transgénico en RF-BN1
40 iguallen la expresión de la barnasa en otros eventos individuales de esterilidad masculina. Como se indica en los ejemplos a continuación, la combinación de la presente invención dio como resultado rendimientos intrínsecamente más altos que la combinación del mismo evento de esterilidad masculina MS-B2 con otros eventos de restablecimiento de la fertilidad.

45 Además, se ha descrito previamente que RF-BN1 está ubicado en el genoma C (véase el documento WO 01/31042; véase también, por ejemplo, www.agbios.com/dbase.php?action=showProd&data=MS8xRF3). En consecuencia, la introducción de RF-BN1 de *B. napus* (aacc) en *B. juncea* (aabb) que no contiene un genoma C no se consideraría sencilla por el experto en la materia. La presente memoria descriptiva proporciona datos de que RF-BN1 se ubica sin embargo en el genoma A, permitiendo la introducción en *B. juncea* mediante cruce.

Además, los ensayos de campo han descubierto que la presencia de MS-B2 aumenta el rendimiento promedio (rendimiento de grano) cuando se compara con una estirpe de plantas isogénicas que no contienen MS-B2.

50 En el presente documento se describe un método para producir semillas híbridas a partir de plantas de colza oleaginosa, tales como *Brassica napus* o *Brassica juncea*, que comprende las etapas de

- proporcionar una planta de colza oleaginosa parental femenina estéril-masculina que comprenda el evento de élite MS-B2 que comprende un gen de esterilidad masculina,
- proporcionar una planta de colza oleaginosa parental masculina fértil-masculina que comprenda el evento de élite RF-BN1 que comprende un gen de restablecimiento de la fertilidad, preferentemente en forma homocigótica;
- 5 - permitir que el polen de la planta de colza oleaginosa parental masculina polinice la planta de colza oleaginosa parental femenina; y
- cosechar semillas híbridas de la planta parental femenina.

El término "gen" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier secuencia de ADN que comprenda varios fragmentos de ADN unidos operativamente tal como un promotor y una región no traducida 5' (la 5'UTR), que juntos forman la región promotora, una región codificante (que puede o puede no codificar una proteína) y una región 3' sin traducir (3'UTR) que comprende un sitio de poliadenilación. Normalmente, en células vegetales, la 5'UTR, la región codificante y la 3'UTR se transcriben en un ARN que, en el caso de un gen que codifica proteína, se traduce en la proteína. Un gen puede incluir fragmentos de ADN adicionales tales como, por ejemplo, intrones. Como se usa en el presente documento, un locus genético es la posición de un gen dado en el genoma de una planta.

El término "quimérico" cuando se refiere a un gen o secuencia de ADN se usa para indicar que el gen o secuencia de ADN comprende al menos dos fragmentos de ADN funcionalmente relevantes (tales como promotor, 5'UTR, región codificante, 3'UTR, intrón) que no están naturalmente asociados entre sí y provienen, por ejemplo, de diferentes fuentes. "Extraño" referido a un gen o una secuencia de ADN con respecto a una especie de planta se usa para indicar que el gen o la secuencia de ADN no se encuentra de forma natural en esa especie de planta, o no se encuentra de forma natural en ese locus genético en esa especie de planta. La expresión "ADN extraño" se usará en el presente documento para referirse a una secuencia de ADN que se ha incorporado en el genoma de una planta como resultado de la transformación. El "ADN transformante", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN recombinante utilizada para la transformación. El ADN transformante, por lo general, comprende al menos un "gen de interés" (por ejemplo, un gen quimérico) que es capaz de conferir una o más características específicas a la planta transformada. La expresión "molécula de ADN recombinante" se usa para ejemplificar y, por tanto, puede incluir, una molécula de ácido nucleico aislada que puede ser ADN y que puede obtenerse a través de procedimientos recombinantes u otros.

Como se usa en el presente documento, el término "transgén" se refiere a un gen de interés que se incorpora en el genoma de una planta. Una "planta transgénica" se refiere a una planta que comprende al menos un transgén en el genoma de todas sus células.

El ADN extraño presente en las plantas de la presente invención comprenderá preferentemente dos genes de interés, más específicamente, un gen de esterilidad masculina y un gen de resistencia a herbicidas, o un gen restablecedor de la fertilidad y un gen de resistencia a herbicidas.

Un "gen de esterilidad masculina" como se usa en el presente documento se refiere a un gen que tras la expresión en la planta hace que la planta sea incapaz de producir polen viable y fértil. Un ejemplo de un gen de esterilidad masculina es un gen que comprende una secuencia de ADN que codifica barnasa, bajo el control de un promotor que dirige la expresión en células del tapete. Más específicamente, de acuerdo con la presente invención, el gen de esterilidad masculina es "TA29-barnasa" como se describe en el presente documento.

Un "gen restablecedor de la fertilidad", como se usa en el presente documento se refiere a un gen que tras la expresión en una planta que comprende un gen de esterilidad masculina, es capaz de evitar la expresión fenotípica del gen de esterilidad masculina, restaurando la fertilidad en la planta. Más específicamente, el gen restablecedor de la fertilidad comprenderá un ADN que codifique una proteína o polipéptido capaz de evitar la expresión fenotípica del gen de esterilidad masculina, bajo el control de un promotor que dirija la expresión en al menos las células en las que se expresa el ADN de esterilidad masculina. Más específicamente, de acuerdo con la presente invención, el gen restablecedor de la fertilidad es "TA29-barstar" como se describe en el presente documento.

La incorporación de una molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta normalmente es resultado de la transformación de una célula o tejido (o de otra manipulación genética). El sitio particular de incorporación se debe ya sea al azar o está en una ubicación predeterminada (si se usa un proceso de integración dirigida).

El ADN extraño puede caracterizarse por la ubicación y la configuración en el sitio de incorporación de la molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta. El sitio en el genoma de la planta donde se ha insertado un ADN recombinante también se denomina "sitio de inserción" o "sitio diana". La inserción del transgén en el genoma de la planta puede asociarse a una supresión del ADN de la planta, denominada "supresión del sitio diana". Una "región flanqueante" o "secuencia flanqueante" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de al menos 20 pb, preferentemente al menos 50 pb y hasta 5000 pb del genoma de la planta que se ubica ya sea inmediatamente corriente arriba y contigua, o inmediatamente corriente abajo y contigua, al ADN extraño. Los procedimientos de transformación que conducen a la integración aleatoria del ADN extraño darán como resultado

transformantes con diferentes regiones flanqueantes, que son características y únicas para cada transformante. Cuando el transgén se introduce en una planta a través del cruce tradicional, su sitio de inserción en el genoma de la planta o sus regiones flanqueantes generalmente no cambiarán. Una "región de inserción" como se usa en el presente documento se refiere a la región que corresponde a la región de al menos 40 pb, preferentemente al menos 100 pb y hasta más de 10000 pb, abarcada por las regiones flanqueantes corriente arriba y corriente abajo de un transgén en el genoma de la planta (sin transformar) e incluye el sitio de inserción (y la posible supresión del sitio diana). Teniendo en cuenta las diferencias menores debidas a mutaciones dentro de una especie, una región de inserción conservará al menos el 85 %, preferentemente el 90 %, más preferentemente el 95 % y mucho más preferentemente el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia que comprende las regiones flanqueantes corriente arriba y corriente abajo del ADN extraño en una planta dada de esa especie.

La expresión de un gen de interés se refiere al hecho de que el gen confiere a la planta uno o más rasgos fenotípicos (por ejemplo, tolerancia a herbicidas) que se pretendían conferir mediante la introducción de la molécula de ADN recombinante, el ADN transformante, utilizado durante la transformación (basándose en la estructura y la función de una parte del gen o todo el gen o los genes de interés).

Un "evento" se define como un locus genético (artificial) que, como resultado de la manipulación genética, transporta un ADN extraño que comprende al menos una copia del gen o los genes de interés. Los estados alélicos habituales de un evento son la presencia o ausencia del ADN extraño. Como se usa en el presente documento, un evento "MS" y un evento "RF" se referirán a eventos que llevan los transgenes "TA29-barnasa" y "TA29-barstar" respectivamente. Un evento se caracteriza fenotípicamente por la expresión de uno o más transgenes. A nivel genético, un evento es parte de la composición genética de una planta. A nivel molecular, un evento se caracteriza por el mapa de restricción (por ejemplo, determinado por transferencia Southern) y/o por las secuencias flanqueantes corriente arriba y/o corriente abajo del transgén, y/o la configuración molecular del transgén. Por lo general, la transformación de una planta con un ADN transformante que comprende al menos un gen de interés conduce a una multitud de eventos, cada uno de los cuales es único.

Un "evento de élite", como se usa en el presente documento, es un evento que se selecciona entre un grupo de eventos, obtenidos por transformación con el mismo ADN transformante o mediante retrocruce con plantas obtenidas mediante dicha transformación, basándose en la expresión y estabilidad del transgén y su compatibilidad con las características agronómicas óptimas de la planta que lo comprende. Por tanto, los criterios para la selección de eventos de élite son uno o más, preferentemente dos o más, ventajosamente todos los siguientes:

- a) Que la presencia del transgén no comprometa otras características deseadas de la planta, tales como las relacionadas con el rendimiento agronómico o el valor comercial;
- b) Que el evento se caracterice por una configuración molecular bien definida que se herede de manera estable y para la que puedan desarrollarse herramientas de diagnóstico apropiadas para el control de identidad;
- c) Que el gen o los genes de interés en el transgén muestren una expresión fenotípica espacial y temporal correcta, apropiada y estable, tanto en condiciones heterocigóticas (o hemicigóticas) como homocigóticas del evento, a un nivel aceptable comercialmente en una gama de condiciones ambientales a las que las plantas que llevan el evento se expongan posiblemente en el uso agronómico normal.

Se prefiere que el ADN extraño se asocie a una posición en el genoma de la planta que permita la introgresión a acervos genéticos comerciales deseados.

El estado de un evento como un evento de élite se confirma mediante la introgresión del evento de élite en diferentes acervos genéticos relevantes y observando el cumplimiento de uno, dos o todos los criterios, por ejemplo, a), b) y c) anteriores.

Adicionalmente, para los transgenes que codifican la esterilidad masculina y el restablecimiento de la fertilidad que se describen en el presente documento, la selección de los eventos de élite también se determinará basándose en la compatibilidad entre estos eventos, más específicamente en que la progenie resultante de un cruce entre una planta que lleva un evento de esterilidad masculina y una planta que lleva un evento restablecedor de la fertilidad, en la que ambos eventos están presentes, tenga las siguientes características:

- a) expresión fenotípica adecuada del fenotipo restablecido de fertilidad, es decir, fertilidad masculina; y
- b) expresión fenotípica a un nivel comercialmente aceptable en un intervalo de condiciones ambientales a las que las plantas que llevan los dos eventos probablemente estén expuestas en el uso agronómico normal.

Por tanto, un "evento de élite" se refiere a un locus genético que comprende un transgén, que responde a los criterios descritos anteriormente. Una planta, material vegetal o progenie, tal como las semillas, pueden comprender uno o más eventos de élite en su genoma.

El evento Elite MS-B2 se ha caracterizado exhaustivamente como se describe en el documento WO 01/31042 (véanse en particular los ejemplos 1 y 3). El ADN transformante se ha descrito en el Ejemplo 1. Las secuencias flanqueantes de ADN de la planta después de la inserción del transgén se han aislado e identificado (véase el documento WO 01/31042, en particular, los ejemplos 3.2, así como las SEQ ID NO: 1 y 2). También se ha descrito una PCR de diagnóstico que permite la identificación del evento de élite MS-B2 en material biológico en el documento WO 01/31042, en particular en el Ejemplo 5. Cuando el evento de élite MS-B2 está presente en plantas, células, semillas o tejidos de *Brassica*, el ADN genómico del mismo puede usarse para amplificar un fragmento de ADN de entre 160 y 200 pb, en particular de aproximadamente 183 pb, usando una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que tengan la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente. La semilla de referencia se ha depositado en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA-850 o PTA-2485. Un nombre alternativo para el evento de Élite MS-B2 es MS 11.

El evento de élite RF-BN1 se ha caracterizado exhaustivamente como se describe en el documento WO 01/41558 (véanse en particular los ejemplos 1b y 4.2.2). El ADN transformante se ha descrito en el Ejemplo 1b. Las secuencias flanqueantes de ADN de la planta después de la inserción del transgén se han aislado e identificado (véase el documento WO 01/31042, en particular, los ejemplos 4.2.2, así como las SEQ ID NO: 5 y 6). También se ha descrito una PCR de diagnóstico que permite la identificación del evento de élite RF-BN1 en material biológico en el documento WO 01/41558, en particular, en el Ejemplo 5.2. Cuando el evento de élite RF-BN1 está presente en las plantas, células, semillas o tejidos de *Brassica*, el ADN genómico del mismo puede usarse para generar un fragmento de ADN de entre 195 y 235 pb, en particular de 215 pb, usando una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que tengan la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8, respectivamente. La semilla de referencia se ha depositado en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA-730. Los nombres alternativos para RF-BN1 son RF3 o ACS-BN003-6.

Las plantas que albergan RF-BN1 o MS-B2, por ejemplo, pueden obtenerse de las semillas depositadas en la ATCC. Dichas plantas pueden propagarse adicionalmente y/o pueden usarse en un esquema de reproducción convencional para introducir el evento de élite de la invención en otros cultivares de la misma especie de planta. Las semillas depositadas pertenecen a la especie *Brassica napus*. Sin embargo, los métodos para introducir alelos o transgenes ubicados en el genoma A de *B. napus* en *B. juncea* son bien conocidos en la técnica e incluyen la retrocruce repetida.

La invención proporciona por primera vez plantas, semillas, células y tejidos de *B. juncea* que comprenden en su genoma nuclear el evento RF-BN1, que comprende un genoma de restablecimiento de la fertilidad. La información disponible anteriormente indicaba que el evento de élite RF-BN1 estaba presente en el genoma C; sin embargo, la información que se proporciona en el presente documento ubicó la inserción RF-BN1 en el genoma A permitiendo la transferencia del evento de élite a *B. juncea*.

Las plantas de *Brassica* que albergan MS-B2 y/o RF-BN1 también se caracterizan por su tolerancia al glufosinato, que en el contexto de la presente invención incluye que las plantas son tolerantes al herbicida Liberty™. La tolerancia a Liberty™ se define según el criterio de que la pulverización de las plantas en la etapa de tres a cuatro hojas (3V a 4V) con al menos 200 gramos de principio activo/hectárea (g.p.a./ha), preferentemente 400 g.p.a./ha y posiblemente hasta a 1600 g.p.a./ha, no mata las plantas. Las plantas que albergan MS-B2 y/o RF-BN1 pueden caracterizarse adicionalmente por la presencia en sus células de fosfinotricina acetil transferasa según se determina mediante un ensayo de PAT (De Block et al, 1987, *EMBO J.* 6: 2513-2518). Las plantas de *Brassica* de la presente invención pueden cultivarse de una manera convencional. La presencia del gen 35S-bar garantiza que son tolerantes al glufosinato. Por tanto, las malezas en los campos donde se cultivan dichas plantas de *Brassica* pueden controlarse mediante la aplicación de herbicidas que comprenden glufosinato como principio activo (tales como Liberty™).

Los ensayos de campo han revelado adicionalmente que la presencia de MS-B2 en plantas de *Brassica* da como resultado un aumento en el rendimiento de semillas o granos en comparación con la estirpe de plantas isogénicas sin MS-B2. En consecuencia, es adecuado para la presente invención un método para aumentar el rendimiento de semillas en plantas de colza oleaginosa que comprende la etapa de proporcionar a la planta de colza oleaginosa un MS-B2 de élite.

Como se usa en las siguientes reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, el término "planta" tiene por objeto abarcar tejidos vegetales, en cualquier etapa de madurez, así como cualesquier células, tejidos u órganos tomados o derivados de cualquier planta de este tipo, incluyendo sin limitación, cualquier semilla, hojas, tallos, flores, raíces, células individuales, gametos, cultivos celulares, cultivos tisulares o protoplastos. Las células vegetales como se usan en el presente documento abarcan células vegetales no regenerables.

Las plantas de "*Brassica*", como se usan en el presente documento, se refieren a plantas de la familia de las *Brassicaceas*, preferentemente plantas que comprenden un genoma A. Preferentemente, la planta de *Brassica* pertenecerá a una de las especies *Brassica napus*, *Brassica rapa* (o *campestris*) o *Brassica juncea*. Como alternativa, la planta puede pertenecer a una especie originada del entrecruzamiento de estas especies de *Brassica*,

tales como *B. napocampestris*, o de un cruce artificial de una de estas especies de *Brassica* con otra especie de las *Cruciferaeas*. Como se usa en el presente documento, "planta oleaginosa" se refiere a una cualquiera de las especies *Brassica napus*, *Brassica rapa* (o *campestris*) o *Brassica juncea*.

5 Las plantas oleaginosas de acuerdo con la presente invención también pueden tratarse con herbicidas incluyendo clopiralida, diclofop, fluazifop, glufosinato, glifosato, metazaclor, trifluralina etametsulfuron, quinmeraco, quizalofop, cletodim, tepraloxidim; con fungicidas, incluyendo azoxistrobina, carbendazim, fludioxonilo, iprodiona, procloraz, vinclozolina o con insecticidas, incluyendo carbofurano, organofosfatos, piretroides, tiacloprid, deltametrina, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, dinetofurano, β -ciflutrina, gamma y lambda cihalotrina, tau-
10 fluvalerato, etiprol, spinosad, spinotoram, flubendiamida, rinaxipir, cazipir o 4-[[[6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-on.

15 Como se usa en el presente documento, "que comprende" debe interpretarse como que especifica la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes indicados, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas o componentes o grupos del mismo. Por tanto, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los citados en realidad, es decir, puede estar incluido en un ácido nucleico o proteína más grande. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ADN que está definida funcional o estructuralmente, puede comprender secuencias de ADN adicionales, etc.

Los siguientes ejemplos describen las características de las plantas de colza oleaginosa que albergan los eventos de élite MS-B2 y RF-BN1.

20 A menos que se indique lo contrario, todas las técnicas de ADN recombinante se realizan de acuerdo con los protocolos convencionales descritos en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, EE.UU. Se describen materiales y métodos convencionales para el trabajo molecular en plantas en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) de R.D.D. Croy publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.

En la descripción y los ejemplos, se hace referencia a las siguientes secuencias:

	SEQ ID NO 1:	secuencia flanqueante 5' MS-B2
	SEQ ID NO 2:	secuencia flanqueante 3' MS-B2
30	SEQ ID NO 3:	cebador oligonucleotídico 1 para la detección de MS-B2
	SEQ ID NO 4:	cebador oligonucleotídico 2 para la detección de MS-B2
	SEQ ID NO 5:	secuencia flanqueante 5' RF-BN1
	SEQ ID NO 6:	secuencia flanqueante 3' RF-BN1
	SEQ ID NO 7:	cebador oligonucleotídico 1 para la detección de RF-BN1
	SEQ ID NO 8:	cebador oligonucleotídico 2 para la detección de RF-BN1
35	SEQ ID NO 9:	plásmido pTHW118
	SEQ ID NO 10:	plásmido pTCO113

La descripción anterior de la invención tiene por objeto ser ilustrativa y no limitante. A los expertos en la materia pueden ocurrírseles diversos cambios o modificaciones en las realizaciones descritas. Éstos pueden realizarse sin apartarse del espíritu o alcance de la invención.

40 Ejemplos

Ejemplo 1. Breve descripción de MS-B2 y RF-BN1

1.1 Evento de élite MS-B2

45 El evento de élite MS-B2 se generó mediante transformación mediada por *Agrobacterium* de plantas de *B. napus* con un ADN quimérico que comprende el gen de barnasa bajo el control de un promotor específico del tapete (pTCO113).

50 El plásmido pTCO113 derivó esencialmente del vector intermedio pGSV1. El vector pGSV1 deriva a su vez de pGSC1700 (Cornelissen y Vandewielle, 1989), pero comprende una región T artificial que consiste en las secuencias de los bordes izquierdo y derecho de la forma de ADN-TL pTiB6S3 y sitios de clonación de multienlazador que permiten la inserción de genes quiméricos entre las repeticiones del borde de ADN-T. El vector pGSV1 está provisto de un gen de barstar en el marco de lectura principal del plásmido, con señales reguladoras para la expresión en *E. coli*.

ES 2 694 131 T3

Una descripción completa del ADN comprendido entre las repeticiones del borde de pTCO113 se proporciona en la Tabla 1 (SEQ ID NO. 10):

Tabla 1. Posiciones de nucleótidos del ADN comprendido entre las repeticiones del borde de ADN-T de TCPO113

Posiciones de Nt	Orientación	Descripción y referencias
1-25		Repetición del borde derecho del ADN-TL de pTiB6S3 (Gielen et al. (1984) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-846).
26-53		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
54-90		Secuencia residual del ADN-TL en la repetición del borde derecho
91-97		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
309-98	Sentido contrario a las agujas del reloj	El extremo 3' sin traducir del gen de ADN-TL 7 (3'g7) de pTiB6S3 (Velten y Schell. (1985) <i>Nucleic Acids Research</i> 13: 6981-6998; Dhaese et al. (1983) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-846).
310-331		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
883-332	Sentido contrario a las agujas del reloj	La secuencia codificante del gen de resistencia a bialafós (<i>bar</i>) de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Thompson et al. (1987) <i>The EMBO Journal</i> 6: 2519-2523). Los dos codones N-terminales de la región codificante de <i>bar</i> de tipo silvestre han sido sustituidos por los codones ATG y GAC, respectivamente.
2609-884	Sentido contrario a las agujas del reloj	El promotor de la subunidad pequeña de la atS1A ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (PssuAra) (Krebbbers et al. (1988) <i>Plant Molecular Biology</i> 11: 745-759).
2610-2659		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
2920-2660	Sentido contrario a las agujas del reloj	Un fragmento TaqI de 260 pb del extremo 3' sin traducir del gen de la nopalina sintasa (3'nos) del ADN-T de pTiT37 y que contiene señales de poliadenilación de la planta (Depicker et al. (1982) <i>Journal of Molecular and Applied Genetics</i> 1: 561-573).
2921-2936		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
3032-2937		Región 3' sin traducir corriente abajo de la secuencia codificante de <i>barnasa</i> de <i>B. amyloliquefaciens</i>
3368-3033	Sentido contrario a las agujas del reloj	La región codificante del gen <i>barnasa</i> de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Hartley (1988) <i>Journal of Molecular Biology</i> 202: 913-915).
4878-3369	Sentido contrario a las agujas del reloj	La región promotora del gen TA29 específico de antera de <i>Nicotiana tabacum</i> . El promotor comprende los 1,5 kb de la secuencia corriente arriba del codón de iniciación ATG (Seurinck et al. (1990) <i>Nucleic Acids Research</i> 18: 3403).
4879-4924		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
4925-5215	Sentido de las agujas del reloj	El promotor del gen de la nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (PNos). La secuencia de nucleótidos del promotor PNos se describe en Depicker et al. (1982) <i>Journal of Molecular and Applied Genetics</i> 1: 561-573.
5216-5217		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
5218-5490	Sentido de las agujas del reloj	La región codificante del gen <i>barstar</i> de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Hartley (1988) <i>Journal of Molecular Biology</i> 202: 913-915).
5491-5530		Secuencia del extremo 3' sin traducir del gen <i>barstar</i> de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
5531-5554		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
5555-5766	Sentido de las agujas del reloj	El extremo 3' sin traducir del gen 7 de ADN-TL (3'g7) de pTiB6S3 (Velten y Schell. (1985) <i>Nucleic Acids Research</i> 13: 6981-6998; Dhaese et al. (1983) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-846).
5767-5773		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
5774-5810		Secuencias residuales de la ADN-TL en la repetición del borde derecho
5811-5840		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
5841-5865		Repetición del borde izquierdo del ADN-TL de pTiB6S3 (Gielen et al. (1984) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-846).

Las secuencias flanqueantes se aislaron como se describe en el documento WO 01/31042.

Región flanqueante derecha (5')

La región flanqueante 5' se amplificó como un fragmento de aproximadamente 415 pb, cuya secuencia completa se determinó (SEQ ID NO. 1). La secuencia entre el nucleótido 1 y el 234 corresponde al ADN de la planta, mientras que la secuencia entre el nucleótido 235 y el 415 corresponde al ADN-T.

5 Región flanqueante izquierda (3')

La región flanqueante 3' se amplificó como un fragmento de aproximadamente 416 pb, cuya secuencia completa se determinó (SEQ ID NO. 2). La secuencia entre el nucleótido 1 y el 193 corresponde al ADN-T, mientras que la secuencia entre el nucleótido 194 y el 416 corresponde al ADN de la planta.

Identificación por PCR de MS-B2

10 Como se describe en el documento WO 01/31042, MS-B2 que comprende material biológico puede identificarse usando el protocolo de identificación de PCR descrito en el mismo.

Pueden usarse los siguientes cebadores, que reconocen específicamente el ADN extraño y una secuencia flanqueante de MS-B2:

15 B01: 5'-gAA.ATC.CAT.gTA.AAg.CAg.CAg.gg-3' (diana: ADN de la planta (SEQ ID NO. 3)
 B02: 5'-gCT.Tgg.ACT.ATA.ATA.CTT.gAC-3' (diana: ADN-T) (SEQ ID NO. 4)

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

para el par de cebadores B01-B02: 183 pb (Evento de Élite MS-B2)

1.2. Evento de Élite RF-BN1

20 El Evento de Élite RF-BN1 se generó mediante la transformación mediada por *Agrobacterium* de plantas de *B. napus* con un ADN quimérico que comprende el gen de barstar bajo el control de un promotor TA29 (pTHW118).

El plásmido pTHW118 también derivó esencialmente del vector intermedio pGSV1 (descrito anteriormente). Una descripción completa del ADN comprendido entre las repeticiones de borde de pTHW118 se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO. 9):

Tabla 2. ADN-T del plásmido pTHW118

Posiciones de Nt	Orientación	Descripción y referencias
1-25		Repetición del borde derecho del ADN-TL de pTiB6S3 (Gielen et al (1984) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-846).
26-53		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
54-90		Secuencia residual del ADN-TL en la repetición del borde derecho.
91-97		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
309-98	Sentido contrario a las agujas del reloj	El extremo 3' sin traducir del gen 7 del ADN-TL (3'g7) de pTiB6S3 (Velten y Schell. (1985) <i>Nucleic Acids Research</i> 13: 6981-6998; Dhaese et al. (1983) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-846).
310-330		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
883-331	Sentido contrario a las agujas del reloj	La secuencia codificante del gen de resistencia a bialafós (<i>bar</i>) de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Thompson et al. (1987) <i>The EMBO Journal</i> 6: 2519-2523). Los dos codones de N-terminales de la región codificante <i>bar</i> de tipo silvestre han sido sustituidos por los codones ATG y GAC, respectivamente.
2608-883	Sentido contrario a las agujas del reloj	El promotor de la subunidad pequeña de la atS1A ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (PssuAra) (Krebbers et al. (1988) <i>Plant Molecular Biology</i> 11: 745-759).
2609-2658		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
2919-2659	Sentido contrario a las agujas del reloj	Un fragmento TaqI de 260 pb del extremo 3' sin traducir del gen de la nopalina sintasa (3'nos) del ADN-T de pTiT37 y que contiene señales de poliadenilación de la planta (Depicker et al. (1982) <i>Journal of Molecular and Applied Genetics</i> 1: 561-573).
2920-2940		Secuencias derivadas del polienlazador sintético

Posiciones de Nt	Orientación	Descripción y referencias
2941-2980		Región 3' sin traducir corriente abajo de la secuencia codificante de <i>barstar</i> de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
3253-2981	Sentido contrario a las agujas del reloj	La región codificante del gen <i>barstar</i> de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Hartley (1988) <i>Journal of Molecular Biology</i> 202: 913-915).
4762-3254	Sentido contrario a las agujas del reloj	La región promotora del gen TA29 específico de antera de <i>Nicotiana tabacum</i> . El promotor comprende las 1,5 kb de la secuencia corriente arriba del codón de iniciación ATG (Seurinck et al. (1990) <i>Nucleic Acids Research</i> 18: 3403).
4763-4807		Secuencias derivadas del polienlazador sintético
4808-4832		Repetición del borde izquierdo del ADN-TL de pTiB6S3 (Gielen et al. (1984) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-846).

Las secuencias flanqueantes se aislaron como se describe en el documento WO 01/41558.

Región flanqueante derecha (5')

5 La región flanqueante 5' se amplificó como un fragmento de aproximadamente 1077 pb, cuya secuencia completa se determinó (SEQ ID NO. 5). La secuencia entre el nucleótido 1 y el 881 corresponde al ADN de la planta, mientras que la secuencia entre el nucleótido 882 y el 1077 corresponde al ADN-T.

Región flanqueante izquierda (3')

La región flanqueante 3' se amplificó como un fragmento de aproximadamente 1500 pb, cuya secuencia completa se determinó (SEQ ID NO. 6). La secuencia entre el nucleótido 1 y el 166 corresponde al ADN-T, mientras que la secuencia entre el nucleótido 167 y el 1441 corresponde al ADN de la planta.

10 Identificación por PCR de RF-BN1

Como se describe en el documento WO 01/41558, puede identificarse material biológico que comprende RF-BN1 usando el protocolo de identificación por PCR que se describe en el presente documento.

Para identificar material vegetal que comprende RF-BN1, se usan los siguientes cebadores, que reconocen específicamente el transgén y una secuencia flanqueante de RF-BN1:

15 BNA03: 5'-TCA.TCT.ACg.gCA.ATg.TAC.CAg-3' (diana: transgén) (SEC ID 7)
 BNA04: 5'-Tgg.ACC.CCT.Agg.TAA.ATg.CC-3' (diana: ADN de la planta) (SEC ID 8)

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

Para el par de cebadores BNA03-BNA04: 215 pb (Evento de élite RF-BN1)

Ejemplo 2. Identificación del genoma en el que se ubica el locus RF-BN1 e introducción en *Brassica juncea*

20 Para determinar si el locus RF-BN1 está ubicado en el genoma A o C de *Brassica napus*, la co-herencia o la unión de RF-BN1 con marcadores conocidos en el genoma de *Brassica* se analizó en 4 poblaciones de *B. napus* BC1 segregantes diferentes derivadas de un cruce entre la estirpe donadora que contenía el transgén RF-BN1 en un estado homocigótico y un progenitor recurrente que no contiene el transgén. El método de PLFA se usó para generar marcadores genéticos. El análisis de PLFA se adaptó de Vos et al. (1995, *NAR* 23: 4407-4414, documento
 25 EP0534858 y US 6.045.994). Con el fin de identificar los marcadores de PLFA unidos a RF-BN1, se realizó un análisis de segregantes en masa (ASM) de acuerdo con Michelmore et al. (1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9823).

30 Todos los marcadores genéticos de PLFA que mostraron amplificación diferencial entre los grupos de plantas positivas para RF-BN1 (que contenían un marcador visible de PLFA) y plantas negativas para RF-BN1 (donde el mismo marcador no era visible) se analizaron en al menos 46 muestras individuales de población BC1 en la que se ha demostrado que el marcador PLFA está potencialmente unido en el análisis de ASM. Solo los marcadores que mostraron una cantidad considerable de co-segregación con el marcador de PCR RFBN1 se mantuvieron, los demás marcadores potenciales que no satisficieron este criterio se descartaron como falsos positivos del análisis ASM. Se realizó un análisis de unión usando los datos de los marcadores PLFA conservados y los datos del
 35 marcador de PCR RF-BN1 generados en plantas individuales para cada población BC1 por separado usando

JoinMap versión 3.0 (Van Ooijen y Voorrips (2001) *JoinMap Version 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps*, Plant Research International, Wageningen, Países Bajos). Como los 4 mapas individuales alrededor del locus RF-BN1 mostraron un acuerdo considerable, estos 4 mapas de BC1 pudieron integrarse en un mapa de BC1 que representaba la región alrededor del locus RF-BN1 usando el mismo software, permitiendo el cartografiado local del locus RF-BN1.

Después, el mapa local resultante de la región RF-BN1 se comparó con un mapa de referencia genético que representa todos los cromosomas de *B. napus*. Para este mapa de referencia, ya se habían asignado números de cromosomas de acuerdo con Sharpe et al. (1995, *Genome* 38: 112-1121) y Parkin et al. (1995, *Genome* 38: 1122-1131). N01 a N10 son cromosomas de genoma A, mientras que N11 a N19 son cromosomas de genoma C. Se descubrió una correlación muy clara entre el mapa de la región RF-BN1 y el cromosoma N07 del mapa de referencia, que se sabe que es un cromosoma de genoma A. RFBN1 se posiciona en el genoma A de *B. napus*.

El evento RF-BN1 se introdujo mediante retrocruzamiento repetido de plantas de la variedad Drakkar que comprendían el evento RFBN1 en un cultivar de *Brassica juncea*. Después de al menos 4 generaciones de retrocruces acelerados, se examinaron las plantas de *B. juncea* y se estableció que:

- a) la presencia del ADN extraño no comprometía otras características deseadas de la planta, tales como las relacionadas con el rendimiento agronómico o el valor comercial;
- b) el evento se caracterizó por una configuración molecular bien definida que se heredó de manera estable; y
- c) el gen o los genes de interés en el ADN extraño mostraron una expresión fenotípica espacial y temporal correcta, apropiada y estable, tanto en condiciones heterocigóticas (o hemicingóticas) como homocigóticas del evento, a un nivel comercialmente aceptable en una gama de condiciones ambientales a las que las plantas que llevan el evento probablemente estén expuestas en un uso agronómico normal. Además, las plantas se evaluaron para determinar sus características agronómicas y su rendimiento en comparación con las especies de *Brassica juncea* de tipo silvestre.

Ensayos exhaustivos en el campo demostraron que RF-BN1 en *Brassica juncea* dio como resultado plantas que mostraron una expresión adecuada de los genes de interés en el ADN extraño, es decir, un fenotipo estéril-masculino, combinada con un rendimiento agronómico óptimo. Por tanto, aunque originariamente se desarrolló en *B. napus*, se descubrió sorprendentemente que RF-BN1 también era un evento de élite en *Brassica juncea*. Además, RF-BN1 pudo usarse eficientemente para restablecer la fertilidad en plantas de *B. juncea* que comprendían MS-B2.

Ejemplo 3. Rendimiento agronómico de plantas MS-B2/RF-BN1

Se sometieron a ensayo de campo plantas de colza oleaginosa Brassica que comprendían eventos MS-B2/RF-BN1, junto con controles de comprobación isogénicas no transgénicas, así como plantas MS-B2 que comprendían otros eventos restablecedores. Los datos de rendimiento relevantes se resumen en las tablas a continuación.

Téngase en cuenta que se incluyeron datos de los ensayos de campo para estirpes de plantas adicionales en el análisis para el cálculo de la media, la significancia, etc.

Quedará claro que las estirpes de plantas que comprenden MS-B2 y RF-BN1 tienen un rendimiento uniformemente más alto que las estirpes de plantas que comprenden MS-B2 y otros eventos de restablecimiento-masculino tales como RF-BN2.

Adicionalmente quedará claro que las estirpes de plantas que comprenden MS-B2 tienen un rendimiento mayor que las estirpes de plantas isogénicas no transgénicas.

Tabla 3. Ensayos de campo en la localización geográfica 1

Descripción de la variable	Rendimiento (9)	
	kg	kg
Estudio genealógico	Media	% de comprobaciones
MS-B2 BC4	1458,95	102,31
Estirpe isogénica	1529,45	107,26
Estirpe isogénica	1552,57	108,88
Estirpe isogénica (densidad de semillas del 75 %)	1560,60	109,44
Estirpe isogénica (densidad de semillas del 50 %)	1560,93	109,46
Estirpe isogénica (densidad de semillas del 50 %)	1573,65	110,35
Estirpe isogénica (densidad de semillas del 75 %)	1581,22	110,89
MS-B2 BC4	1886,26	132,28

Descripción de la variable	Rendimiento (9)	
	kg	kg
Estudio genealógico	Media	% de comprobaciones
MS-B2 BC4 x RF-BN 1+ accBC3	1468,76	103,00
MS-B2 BC4 x RF-BN2	1013,52	71,08
MS11 BC4 x RF-BN1+ accBC3	1486,27	104,23
MS11 BC4 x RF-BN2+ BC4	1017,70	71,37
MS11 BC4 x RF-BN1+ accBC3	1522,29	106,75
MS11 BC4 x RF-BN2+ BC5	1183,72	83,01
MS11 BC4 x RF-BN1+ accBC3	1565,97	109,82
MS11 BC4 x RF-BN2+ BC5	1172,28	82,21
Media	1403,99	98,46
Media de comprobaciones	1425,99	100,00
Significancia	**	**
d.s.m.p. 5 %	362,98	25,45
d.s.m.p. 1 %	479,76	33,64
i.s.m.p. 5 %	486,84	34,14
i.s.m.p. 1 %	548,55	38,47
CV	20,50 %	20,50 %
Desv. típica res.	289,36	20,29
N.º de repeticiones analizadas	4	4

Tabla 4. Ensayos de campo en la ubicación geográfica 2

Descripción de la variable	Rendimiento (9)	
	kg	kg
Estudio genealógico	Media	% de comprobaciones
MS-B2 BC4	1573,12	93,52
Estirpe isogénica (densidad de semillas del 50 %)	1671,86	99,39
Estirpe isogénica (densidad de semillas del 75 %)	1689,03	100,41
Estirpe isogénica	1692,71	100,63
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3	1776,16	105,59
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC4	1285,16	76,40
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3	1716,48	102,04
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC5	1255,13	74,61
MS-B2 BC4 x RF-BN1 RF-BN1 BC5F2	1973,41	117,31
Media	1586,57	94,32
Media de comprobaciones	1682,23	100,00
Significancia	**	**
d.s.m.p. 5 %	186,23	11,07
d.s.m.p. 1 %	247,68	14,72
i.s.m.p. 5 %	274,69	16,33
i.s.m.p. 1 %	326,83	19,43
CV	8,28 %	8,28 %
Desv. típica res.	131,68	7,83
N.º de repeticiones analizadas	4	4

Tabla 5. Los ensayos de campo en la localización geográfica 3

Descripción de la variable	VIGAB	Rendimiento (9)	Rendimiento (9)
	1-9	kg	kg
Código de la variable			
Estudio genealógico	Media	Media	% de comprobaciones
MS-B2 BC4	4,91	1914,55	102,88
MS-B2 BC4	4,94	1932,70	103,85
MS-B2 BC4	4,89	1952,49	104,92
Estirpe isogénica	7,34	1783,81	95,85
Estirpe isogénica (densidad de semillas del 50 %)	7,33	1784,18	95,87
Estirpe isogénica	7,31	1786,08	95,98
Estirpe isogénica (densidad de semillas del 75 %)	7,37	1792,20	96,30
Estirpe isogénica (densidad de semillas del 50 %)	7,33	1811,31	97,33
MS-B2 BC4	4,90	1946,01	104,57
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3	5,56	2066,72	111,06
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC4	5,23	1690,12	90,82
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC4	5,19	1719,02	92,37
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC5	5,22	1742,14	93,61
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC5	5,20	1755,62	94,34
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3	5,98	1954,28	105,01
MS-B2 BC4 x RF-BN1 RF-BN1 BC5F2	6,27	1965,55	105,62
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3	6,01	1996,10	107,26
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3	5,51	20 62,47	110,83
MS-B2 BC4 x RF-BN1 RF-BN1 BC5F2	5,55	1921,95	103,28
Media	5,93	1853,67	99,61
Media de comprobaciones	6,91	1860,98	100,00
Significancia	**	**	**
d.s.m.p. 5 %	0,42	140,25	7,54
d.s.m.p. 1 %	0,55	185,37	9,96
i.s.m.p. 5 %	0,56	188,52	10,11
i.s.m.p. 1 %	0,63	211,95	11,39
CV	5,67 %	6,17 %	6,17 %
Desv. típica res.	0,34	113,87	6,12
N.º de repeticiones analizadas	4	4	4

Tabla 6. Resumen de los ensayos de campo

	PROMEDIO (N = 7)	
	RENDIMIENTO (G)	
ESTUDIO GENEALÓGICO	NTR	1 AP
MS-B2 X RF-BN1	108,1 %	113,7 %
ESTIRPE ISOGÉNICA NO TRANGÉNICA	100 %	104,5 %
MS-B2	114,1 %	112,1 %
RF-BN1	95,1 %	92,3 %
CV		
MDS		10,6 %

Ejemplo 4. Rendimiento agronómico de plantas de *B. napus* MS-B2/RF-BN1 en comparación con plantas de *B. napus* MS-BN1/RF-BN1

- 5 Los ensayos de campo se realizaron en 5 ubicaciones (4 réplicas/parcelas completas) para confirmar el restablecimiento y evaluar la tolerancia a herbicidas y el rendimiento agronómico de los híbridos de *B. napus* MS-B2/RF-BN1 en comparación con los híbridos MS-BN1/RF-BN1 con el mismo acervo genético.

Se determinaron el rendimiento y el vigor en ausencia de una pulverización de glufosinato (A) o cuando se trataron

una vez (B) o dos veces (C) con aplicaciones convencionales de glufosinato (Liberty®).

Los resultados se resumen en la Figura 1. El vigor de los híbridos MS-B2/RF-BN1 es siempre superior al vigor de MS-BN1/RF-BN1, ya sea sin tratar (A), tratado una vez (B) o tratado dos veces (C) con glufosinato de amonio.

5 En general, los híbridos MS-B2/RF-BN1 tendieron a florecer (inicio y final) antes y maduraron antes que los híbridos MSBN1/RF-BN1.

El rendimiento también se determinó para los ensayos de campo del tipo A, B, C descritos anteriormente y los resultados se resumen en la Figura 2. Los híbridos MS-B2/RF-BN1 tienen un rendimiento de un 2 a un 5 % más alto que los híbridos MS-BN1/RF-BN1.

También se observó que el restablecimiento en MS-B2/RF-BN1 fue completo en todos los genotipos y ubicaciones.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer CropScience NV

<120> Plantas de Brassica híbridas y métodos para producir las mismas

15 <130> BCS 13-2007

<160> 10

20 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 415

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Región flanqueante del borde 5' del evento de élite MS-B2

30 <400> 1

```

gtcgagtttg gtgttcatga ttttgggttt tgactcttca ccattacata ttgaaactct      60
tacggatgag aacaactcac aagcattaat catgttcata taaatatatg tacattatac      120
gtatatatac acgtatacaa atagtagcga agaaatccat gtaaagcagc agggggcacc      180
atggtttcaa gtattatata atttataatta taattatggt aggatgtaca tggccgataa      240
gaaaaggcaa tttgtagatg ttaattccca tcttgaaaga aatatagttt aatatattat      300
tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa cataaattta ttgatgcaag      360
tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct ggtacattgc cgtag      415
    
```

<210> 2

35 <211> 416

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

40 <223> Región flanqueante del borde 3' del evento de élite MS-B2

<400> 2

ES 2 694 131 T3

ctacggcaat gtaccagctg atataatcag ttattgaaat atttctgaat ttaaacttgc 60
 atcaataaaw ttatgttttt gcttgacta taatacctga cttgttattt tatcaataaa 120
 tttttaaact atatttcttt caagatggga attaacatct acaaattgcc ttttcttctc 180
 gaccatgtac atcctacat aattataatt ataattatat aatactgaaa ccatggtgcc 240
 ccctgctgct ttacatggat ttctccgcta ctatttgtat acgtgtatat ataccgata 300
 atgtacatat atttatatga acatgattaa tgcttgtgag ttgttctcat ccgtaagagt 360
 ttcaatatgt aatggtgaag agtcaaaacc caaatcatg aacacccaaa ctcgat 416

5 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico 1 para la detección de MS-B2

<400> 3
 gaaatccatg taaagcagca ggg 23

15 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico 2 para la detección de MS-B2

<400> 4
 gcttgacta taacttga c 21

25 <210> 5
 <211> 694
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Región flanqueante 5' de RF-BN1

<400> 5

ES 2 694 131 T3

```

ggttttcgga ggtccgagac gagttcaaaa atacatttta cataatatat ttttcatata      60
tatatatata tataacattc aaaagtttga attattacat aaacgttttc taaattttct      120
tcaccaaaaat tttataaact aaaattttta aatcatgaac aaaaagtatg aatttgtaat      180
ataaatataca agatacaaat ttttgattga aatatttgta gctgtcaaaa aagtaaactct      240
tagaatttta attaactata gtaaactata tattgaaaat attataaatt tttatcaaat      300
tctcataaat atataaaata aatctaactc atagcatata aaaagaagac taatgtggat      360
caaaatattt acagtttttt agaagtagaa tctttatagt tttatttaaa atatagcaaa      420
aatgatcaca aacctagtta ctttaaccag aagtccaatt caaaatcaaa taaaaataaa      480
aatctatcta aaaaaatag ttaactacca tgcaaaagta tttttttttg taattagaaa      540
ccctgaaatt tgtacaaaac ttggaccctc aggtaaatgc ctttttcac tcgcgataag      600
aaaaggcaat ttgtagatgt taattcccat cttgaaagaa atatagttta aatatttatt      660
gataaaaata caagtcaggt attatagtcc aagc                                     694

```

5 <210> 6
 <211> 1279
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Región flanqueante 3' de RF-BN1
 <400> 6

ES 2 694 131 T3

```

gggggttttt ttttttgatc aataactttg ttgggcttat ggtcgataag cgtgcgcatg      60
tctgatggta catgctaaat gctatatttc tgtttaaagt gttaaaatca ttttctgatg      120
gaactaaatc cagttttaag agtaactgac aagtacaatt aagcacaaca ataaaatagt      180
agtaattggc atctttgatt gttaaatatc aaacaataaa gttcaaaaaa aaataccaac      240
ccaataatga agacttggcg gagacagtgc cgtgcgaagg ttttcggagg tccgagacga      300
gttcaaaaaat acattttaca taatatattt ttcatatata tatatatata taacattcaa      360
aagtttgaat tattacataa acgttttcta aattttcttc accaaaattt tataaactaa      420
aatttttaaa tcatgaacaa aaagtatgaa tttgtaatat aaatacaaaag atacaaattt      480
ttgattgaaa tattggtagc tgtcaaaaaa gtaaactctta gaatttaaat taactatagt      540
aaactatata ttgaaaatat tataaatttt tatcaaattc tcataaatat ataaaataaa      600
tctaactcat agcatataaa aagaagacta atgtggatca aaatatttac agttttttag      660
aagtagaatc tttatagttt tatttaaaat atagcaaaaa tgatcacaaa cctagttact      720
ttaaccagaa gtccaattca aaatcaaata aaaataaaaa tctatctaaa aaaatatgtt      780
aactaccatg caaaagtatt tttttttgta attagaaacc ctgaaatttg taaaaaactt      840
ggaccctag gtaaattccc tagaaagtat cctattagcg tcgacaaact gttgctcata      900
ttttctctc cttactttat atcatacact aatataaaaa gatgatctaa ttaattattc      960
atttccatgc tagctaattc aagaaaaaga aaaaaaactt attatctaaa cttatattcg     1020
agcaacacct cggagataac aggatatatg tcattaatga atgcttgaac tcatctcgcg     1080
aactcatctc gcatcgctta tagccacaaa gatccaaccc ctctcttcaa tcatatatca     1140
gtagtacaat acaaatagat attgtgagca catatgccgt ctagtactga tgtgtatatg     1200
tagaggagcc gcaaagtgtt agtcactcca acaaatgagc atgaccacgc atcttctgat     1260
gatgtacagc cgtcccttt                                     1279

```

```

5  <210> 7
   <211> 21
   <212> ADN
   <213> Artificial

10 <220>
   <223> Cebador oligonucleotídico 1 para la detección de RF-BN1

   <400> 7
   tcatctacgg caatgtacca g      21

15 <210> 8
   <211> 20
   <212> ADN
   <213> Artificial

20 <220>
   <223> Cebador oligonucleotídico 2 para la detección de RF-BN1

   <400> 8
   tggaccoccta ggtaaatgcc      20

```

ES 2 694 131 T3

<210> 9
 <211> 4832
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Plásmido pTHW118
 10 <400> 9

```

aattacaacg gtatatatcc tgccagtaact cggcgcgtoga actcgggccgt cgagtacatg      60
gtcgcataaga aaaggcaatt tgtagatggt aattcccatc ttgaaagaaa tatagtttaa      120
atatttattg ataaaataac aagtcaggta ttatagtcca agcaaaaaca taaatttatt      180
gatgcaagtt taaattcaga aatatttcaa taactgatta ttcagctgg tacattgccg      240
tagatgaaag actgagtgcg atattatgtg taatacataa attgatgata tagctagctt      300
agctcatcgg gggatcctag acgcgtgaga tcagatctcg gtgacgggca ggaccggacg      360
gggcggtacc ggcaggctga agtccagctg ccagaaacct acgtcatgcc agttcccgtg      420
cttgaagccg gccgccgca gcatgcccg cggggcatat ccgagcgcct cgtgcatgcg      480
cacgctcggg tcgttgggca gcccgatgac agcgaccacg ctcttgaagc cctgtgcctc      540
cagggacttc agcaggtggg tgtagagcgt ggagcccagt cccgtccgct ggtggcgggg      600
ggagacgtac acggtcgact cggccgtcca gtcgtaggcg ttgcgtgcct tcagggggcc      660
cgcgtaggcg atgccggcga cctgcgcgtc cacctcggcg acgagccagg gatagcgcct      720
ccgcagacgg acgaggtcgt ccgtccactc ctgcggttcc tgcggctcgg tacggaagtt      780
gaccgtgctt gtctcgatgt agtggttgac gatggtgcag accgccggca tgtcccgcctc      840
ggtggcacgg cggatgtcgg ccgggcgtcg ttctgggtcc attgttcttc tttactcttt      900
gtgtgactga ggtttggtct agtgctttgg tcatctatat ataatgataa caacaatgag      960
aacaagcttt ggagtgatcg gaggtctag gatacatgag attcaagtgg actaggatct     1020
acaccgttgg attttgagtg tggatatgtg tgaggttaat tttacttggg aacggccaca     1080
aaggcctaag gagaggtggt gagaccotta tcggcttgaa ccgctggaat aatgccacgt     1140
ggaagataat tccatgaatc ttatcgttat ctatgagtga aattgtgtga tgggtggagtg     1200
gtgcttgctc attttacttg cctggtggac ttggcccttt ccttatgggg aatttatatt     1260
ttacttacta tagagcttcc ataccttttt tttaccttgg atttagttaa tatataatgg     1320
tatgattcat gaataaaaat gggaaatfff tgaatftgta ctgctaaatg cataagatta     1380
ggtgaaactg tggaatatat atftttttca tftaaaagca aaatftgcct tttactagaa     1440
  
```

ES 2 694 131 T3

ttataaatat agaaaaatat ataacattca aataaaaaatg aaaataagaa ctttcaaaaa 1500
 acagaactat gtttaattgtg taaagattag tgcacatca agtcatctgt tacaatatgt 1560
 tacaacaagt cataagcca acaaagttag cacgtctaaa taaactaaag agtccacgaa 1620
 aatattacaa atcataagcc caacaaagtt attgatcaaa aaaaaaaaaac gcccaacaaa 1680
 gctaaacaaa gtccaaaaaa aacttotcaa gtctccatct tcctttatga acattgaaaa 1740
 ctatacacia aacaagtacg ataaatctct ttctgggctt gtottccaa cctcctacat 1800
 cacttcccta tcggattgaa tgttttactt gtacctttc cgttgcaatg atattgatag 1860
 tatgtttgtg aaaactaata gggttaacaa tcgaagtcac ggaatatgga tttggtccaa 1920
 gattttccga gagctttcta gtagaaagcc catcaccaga aatttactag taaaataaat 1980
 caccaattag gtttcttatt atgtgccaaa ttcaatataa ttatagagga tatttcaaat 2040
 gaaaacgtat gaatgttatt agtaaaggt caggtaaagac attaaaaaa tcctacgtca 2100
 gatattcaac tttaaaaatt cgatcagtggt ggaattgtac aaaaatttgg gatctactat 2160
 atatataata tgctttacaa cacttggtt ttttttggga ggctggaatt ttaactctac 2220
 atatttgttt tggccatgca ccaactcatt gtttagtgta atactttgat tttgtcaaat 2280
 atatgtgttc gtgtatattt gtataagaat ttctttgacc atatacacac acacatatat 2340
 atatatatat atatattata tatcatgcac ttttaattga aaaaataata tatatatata 2400
 tagtgcattt tttctaacaa ccatatatgt tgcgattgat ctgcaaaaat actgctagag 2460
 taatgaaaaa tataatctat tgctgaaatt atctcagatg ttaagatttt cttaaagtaa 2520
 attctttcaa attttagcta aaagtcttgt aataactaaa gaataatata caatctcgac 2580
 cacggaaaaa aacacataa taaatttgaa ttogaccgc ggtaccgga attogagctc 2640
 ggtaaccggg gatcttcccg atctagtaac atagatgaca ccgogcgca taatttatcc 2700
 tagtttgcgc gctatatttt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta 2760
 atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgtaattat tacatgctta 2820
 acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt 2880
 aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgcttcgg atcctctaga ccaagcttgc 2940
 gggtttgtgt ttccatattg ttcatotccc attgatcgta ttaagaaagt atgatggtga 3000
 tgtcgcagcc ttccgctttc gcttcacgga aaacctgaag cacactctcg gcgccatttt 3060
 cagtcagctg ctgtctttgt tcaaaactgcc tcattccaa aacgagcggg tactccacco 3120
 atccggctcag acaatcccat aaagcgtcca ggtttcacc gtagtattcc ggaagggcaa 3180
 gctccttttt caatgtctgg tggaggctgc tgatacttct gatttggtcc ccgttaatga 3240
 ctgctttttt catcggtagc taatttcttt aagtaaaaac tttgatttga gtgatgatgt 3300

ES 2 694 131 T3

tgtactgtta cacttgcacc acaagggcat atatagagca caagacatac acaacaactt 3360
gcaaaaactaa cttttgttgg agcatttcga ggaaaatggg gagtagcagg ctaatctgag 3420
ggtaacatta aggtttcatg tattaatttg ttgcaaacat ggacttagtg tgaggaaaaa 3480
gtacccaaaat tttgtctcac cctgatttca gttatggaaa ttacattatg aagctgtgct 3540
agagaagatg tttattctag tocagccacc caccttatgc aagtctgctt ttagcttgat 3600
tcaaaaactg atttaattta cattgctaaa tgtgcatact togagcctat gtcgctttaa 3660
ttcgagtagg atgtatatat tagtacataa aaaatcatgt ttgaatcatc tttcataaag 3720
tgacaagtca attgtccctt cttgtttggc actatattca atctgttaat gcaaattatc 3780
cagttatact tagctagata tccaattttg aataaaaata gctcttgatt agtaaaccgg 3840
atagtgacaa agtcacatat coacaaaact tctggtgctc gtggctaagt tctgatcgac 3900
atgggggtaa aatttaaatt gggacacata aatagcctat ttgtgcaaat ctcccctog 3960
aaaatgacag attgttacet ggaaaacaaa aagtcctctg atagaagtcg caaagtatca 4020
caatthtcta tcgagagata gattgaaaga agtgcagggg agcgggtaac tggaacataa 4080
cacaatgtct aaattaattg cattcgctaa ccaaaaagtg tattactctc tccggctcac 4140
aataagttat tttttggccc tttttttatg gtccaaaata agtgagtttt ttagatttca 4200
aaaatgattt aattattht ttaactacagt gcccttggag taaatgggtg tggagtatgt 4260
gttagaaatg tttatgtgaa gaaatagtaa aggttaatat gatcaatttc attgctatth 4320
aatgttaaaa tgtgaatttc ttaatctgtg tgaaaacacc aaaaaatcac ttattgtgga 4380
ccggagaaaag tatataaata tatatthtggg agcgactaaa aataaactth tctcatatta 4440
tacgaaccta aaaacagcat atggtagtht ctagggaatc taaatcacta aaattaataa 4500
aagaagcaac aagtatcaat acatatgatt tacaccgtca aacacgaaat tcgtaaatat 4560
ttaatataat aaagaattaa tccaaatagc ctcccacct atkacttaaa ctaaaaataa 4620
ccagcgaatg tatattatat gcataattht tatattaat gtgtataatc atgtataatc 4680
aatgtataat ctatgtatat ggttagaaaa agtaaacaat taatatagcc ggctattht 4740
gtaaaaatcc ctaatataat cgcgacggat ccccggggat tccggggaag cttagatcca 4800
tggagccatt tacaattgaa tatatcctgc cg 4832

<210> 10
<211> 5865
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN-T del plásmido pCO113

<400> 10

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact cggccgtcga actcggccgt cgagtacatg 60

ES 2 694 131 T3

gtcgataaga aaaggcaatt tgtagatggt aattcccac ttgaaagaaa tatagtttaa 120
 atattttattg ataaaaataac aagtcaggta ttatagttca agcaaaaaaca taaattttatt 180
 gatgcaagtt taaattcaga aatatttcaa taactgatta tatcagctgg tacattgccg 240
 tagatgaaag actgagtgcg atattatgtg taatacataa attgatgata tagctagctt 300
 agctcatcgg gggatcctag aacgcgtgat ctcagatctc ggtgacgggc aggaccggac 360
 ggggocggtac cggcaggctg aagtcacagct gccagaaacc cacgtcatgc cagttcccgt 420
 gcttgaagcc ggccgccgc agcatgccgc gggggcata tccgagcgc tcgtgcatgc 480
 gcacgctcgg gtcgttgggc agcccgatga cagcgaccac gctcttgaag ccctgtgcct 540
 ccagggactt cagcagggtg gtgtagagcg tggagcccag tccogtccgc tgggtggcgg 600
 gggagacgta cacggtcgc tggccgctcc agtcgtaggc gttgcgtgcc ttccaggggc 660
 ccgcttaggc gatgccggcg acctcggcgt ccacctcggc gaogagccag ggatagcgt 720
 cccgcagacg gacgaggtcg tccgtccact cctgcggttc ctgcggctcg gtacggaagt 780
 tgaccgtgct tgtctcgatg tagtgggtga cgatggtgca gaccgcccgc atgtccgct 840
 cgggtggcacg gcggatgtcg gccgggcgctc gttctgggtc cattgttctt ctttactctt 900
 tgtgtgactg aggtttggtc tagtgctttg gtcactata tataatgata acaacaatga 960
 gaacaagctt tggagtgate ggagggtcta ggatacatga gattcaagtg gactaggatc 1020
 tacaccgttg gatthttagt gtggatagtg gtgaggttaa ttttacttgg taaccgccac 1080
 aaaggcctaa ggagaggtgt tgagaccctt atcggttga accgctggaa taatgccacg 1140
 tggaagataa ttccatgaat cttatcgta tctatgagtg aaattgtgtg atggtggagt 1200
 ggtgcttgcct cattttactt gcctgggtgga cttggccctt tcottatggg gaatttatat 1260
 tttacttact atagagcttt catacctttt ttttaccttg gatttagtta atatataatg 1320
 gtatgattca tgaataaaaa tgggaaattt ttgaatttgt actgctaaat gcataagatt 1380
 aggtgaaact gtggaatata tatttttttc atttaaaagc aaaatttgcc ttttactaga 1440
 attataaata tagaaaaata tataacattc aaataaaaat gaaaataaga actttcaaaa 1500
 aacagaacta tgtttaatgt gtaaagatta gtcgcacatc aagtcactctg ttacaatatg 1560
 ttacaacaag tcataagccc aacaaagtta gcacgtctaa ataaactaaa gagtccacga 1620
 aaatattaca aatcataagc ccaacaaagt tattgatcaa aaaaaaaaaa cgccaacaa 1680
 agctaaacaa agtccaaaaa aaacttctca agtctccatc ttctttatg aacattgaaa 1740
 actatacaca aaacaagtca gataaatctc tttctgggcc tgtcttccca acctcctaca 1800
 tcaactccct atcgattga atgttttact tgtacctttt ccgttgcaat gatattgata 1860
 gtatgtttgt gaaaactaat agggttaaca atogaagtca tggaatatgg atttgggtcca 1920

ES 2 694 131 T3

agattttccg agagctttct agtagaaagc ccatcaccag aaatttacta gtaaaaataaa 1980
 tcaccaatta ggtttcttat tatgtgccaa attcaatata attatagagg atatttcaaaa 2040
 tgaaaacgta tgaatgttat tagtaaagtg tcaggtaaga cattaaaaaa atcctacgtc 2100
 agatattcaa ctttaaaaat tcgatcagtg tggaaattgta caaaaatttg ggatctacta 2160
 tatatatata atgctttaca acacttggat ttttttttgg aggctggaat ttttaactca 2220
 catatttggt ttggccatgc accaactcat tgtttagtgt aatactttga ttttgcmeta 2280
 tatatgtggt cgtgtatatt tgtataagaa tttctttgac catatacaca cacacataata 2340
 tatatatata tatatattat atatcatgca cttttaattg aaaaaataat atatatatat 2400
 atagtgcatt ttttctaaca accatataatg ttgcgattga tctgcaaaaa tactgctaga 2460
 gtaatgaaaa atataactca ttgctgaaat tatctcagat gttaagattt tcttaaagta 2520
 aattctttca aatttttagct aaaagtcttg taataactaa agaataatac acaatctcga 2580
 ccacggaaaa aaaacacata ataaatttga atttcgaccg cggtaaccgg aattcgagct 2640
 cggtaaccgg ggatcttccc gatctagtaa catagatgac accgogcgcg ataatttata 2700
 ctagtttgcg cgctatattt tgttttctat cgcgtattaa atgtataatt gcgggactct 2760
 aatcataaaa acccatctca taaataacgt catgcattac atgttaatta ttacatgott 2820
 aacgtaattc aacagaaatt atatgataat catcgcaaga ccggcaacag gattcaatct 2880
 taagaaactt tattgcaaaa tgtttgaacg atctgcttcg gatcctctag agccggaaag 2940
 tgaaattgac cgatcagagt ttgaagaaaa atttattaca cactttatgt aaagctgaaa 3000
 aaaaacggcct ccgcaggaag ccggtttttt cgttatctga tttttgmeta ggtctgmeta 3060
 tggctccgttg ttttgmeta cagccagctc cttgagmeta gaatccggtc tgaatttctg 3120
 aagcctgatg tatagttaat atccgcttca ccgatgttc gtcgcgtttt gcccgggagt 3180
 ttgccttccc tgtttgmeta gatgtctccg ccgatgcttt tcccgggagc gacgtctgca 3240
 aggttccctt ttgatgccac ccagccgagg gcttgtgctt ctgattttgt aatgmeta 3300
 tcaggtagct tatgatatgt ctgaagmeta tccgcaacc cgtcaaacgt gttgmeta 3360
 ggtaccatgg tagctaattt ctttaagmeta aaactttgat ttgagtgatg atgttgact 3420
 gttacacttg caccacaagg gcatatatag agcacaagac atacacaaca acttgmeta 3480
 ctaacttttg ttggagcatt tcgaggmeta tggggagtag caggctaatac tgagggmeta 3540
 attaaggttt catgtataa tttgttgca acatggactt agtgtgagga aaaagtaaca 3600
 aaattttgct tcaccctgat ttcagttatg gaaattacat tatgaagctg tgctagmeta 3660
 gatgtttatt ctagtccagc caccacctt atgcaagtct gcttttagct tgattcaaaa 3720
 actgatttaa tttacattgc taaatgtgca tacttcgagc ctatgtcgtt ttaattcgag 3780
 taggatgat atattagta ataaaaaatc atgtttgaaat catctttcat aaagtmeta 3840

ES 2 694 131 T3

gtcaattgtc ccttottggt tggcactata ttcaatctgt taatgcaaat tatccagtta 3900
 tacttagcta gatatccaat tttgaataaa aatagctctt gattagtaaa ccggatagtg 3960
 acaaagtcac atatccatca aacttctggt gctcgtggct aagttctgat cgacatgggg 4020
 ttaaaattta aattgggaca cataaatagc ctatctgtgc aaatctcccc atcgaaaatg 4080
 acagattggt acatggaaaa caaaaagtcc tctgatagaa gtcgcaaagt atcacaattt 4140
 tctatcgaga gatagattga aagaagtgca gggaagcggg taactggaac ataacacaat 4200
 gtctaaatta attgcattcg ctaacccaaa agtgtattac tctctcggg ccacaataag 4260
 ttatcttttg gccctttttt tatggtccaa aataagtgag ttttttagat ttcaaaaatg 4320
 atttaattat ttttttacta cagtgcctt ggagtaaatg gtgttgagat atgtgttaga 4380
 aatgtttatg tgaagaaata gtaaaggtta atatgatcaa tttcattgct atttaatggt 4440
 aaaatgtgaa tttcttaatc tgtgtgaaaa caacccaaaa atcacttatt gtggaccgga 4500
 gaaagtatat aaatatatat ttggaagcga ctaaaaataa acttttctca tattatacga 4560
 acctaaaaac agcatatggt agtttctagg gaatctaata cactaaaatt aataaaagaa 4620
 gcaacaagta tcaatacata tgatttacac cgtcaaacac gaaattcgta aatatttaat 4680
 ataataaaga attaatccaa atagcctccc acctataac ttaaaactaaa aataaccagc 4740
 gaatgtatat tatatgcata atttatatat taaatgtgta taatcatgta taatcaatgt 4800
 ataatctatg tatatgggta gaaaaagtaa acaattaata tagccggcta tttgtgtaaa 4860
 aatccctaata ataatcgoga cggatccccg ggaattccgg ggaagcttag atccatgcag 4920
 atctgatcat gagcggagaa ttaagggagt cacgttatga cccccgoga tgacgoggga 4980
 caagccggtt tacgtttgga actgacagaa ccgcaacgat tgaaggagcc actcagccgc 5040
 gggtttctgg agtttaatga gctaagcaca tacgtcagaa accattattg cgcgttcaaa 5100
 agtcgcctaa ggtcaactatc agctagcaaa tatttcttgt caaaaatgct ccaactgacgt 5160
 tcataaatt cccctcggta tccaattaga gtctcatatt cactctcaat ccaaaccatg 5220
 aaaaagcag tcattaacgg ggaacaaatc agaagtatca gcgacctoca ccagacattg 5280
 aaaaaggagc ttgcocttcc ggaatactac ggtgaaaacc tggacgcttt atgggattgt 5340
 ctgacggat ggggtggagta cccgctcgtt ttggaatgga ggcagtttga acaaagcaag 5400
 cagctgactg aaaatggcgc cgagagtgtg cttcagggtt tccgtgaagc gaaagcggaa 5460
 ggctgcgaca tcaccatcat actttcttaa tacgatcaat gggagatgaa caatatggaa 5520
 acacaaacce gcaagcttgg tctagaggat cccccgatga gctaagctag ctatatcatc 5580
 aatttatgta ttacacataa tatcgactc agtctttcat ctacggcaat gtaccagctg 5640
 atataatcag ttattgaaat atttctgaat ttaaacttgc atcaataaat ttatgttttt 5700

ES 2 694 131 T3

gcttgacta taatacctga cttgttattt tatcaataaa tatttaaact atatttcttt	5760
caagatggga attaacatct acaaattgcc tttcttctc gaccatgtac atogagetct	5820
cccagatct gcatggagcc attacaatt gaatatatcc tgccg	5865

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta de colza oleaginosa que comprende en su genoma nuclear al menos una copia del evento de élite MS-B2, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA 2485 o ATCC_PTA-850 y al menos una copia del evento de élite RF-BN1, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA-730, en la que dicha planta de colza oleaginosa pertenece a la especie *Brassica napus* o *Brassica juncea*.
2. Una célula o tejido o semilla de la planta de colza oleaginosa de la reivindicación 1 que comprende en su genoma nuclear al menos una copia del evento de élite MS-B2 como se describe en la reivindicación 1, y al menos una copia del evento de élite RF-BN1 como se describe en la reivindicación 1.
- 10 3. Una pareja de plantas de colza oleaginosa, consistiendo dicha pareja en dos plantas de colza oleaginosa en combinación, adecuadas para la producción de semillas híbridas mediante cruce entre sí, siendo una de dichas plantas de colza oleaginosa una planta de colza oleaginosa femenina estéril-masculina que comprende el evento de élite MS-B2 que comprende un gen de esterilidad masculina, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA 2485 o ATCC_PTA-850 y
- 15 siendo la otra de dichas plantas de colza oleaginosa una planta de colza oleaginosa fértil-masculina que comprende el evento de élite RF-BN1 que comprende un gen restablecedor de la fertilidad, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA-730, en la que la planta que comprende el evento de élite RF-BN1 tiene la capacidad de restablecer la fertilidad en plantas que comprenden el evento de élite MS-B2.
- 20 4. ADN genómico de una planta de colza oleaginosa de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho ADN genómico al menos una copia del evento de élite MS-B2 como se describe en la reivindicación 1 y al menos una copia del evento de élite RF-BN1 como se describe en la reivindicación 1.
5. Una planta o célula vegetal de *Brassica juncea* que comprende el evento de élite RF-BN1, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA-730.
- 25 6. Semilla de la planta de *Brassica juncea* de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende el evento de élite RF-BN1, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA-730.
- 30 7. La planta o célula de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente el evento de élite MS-B2, estando depositada la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite en la ATCC con el número de depósito ATCC_PTA 2485 o ATCC_PTA-850.

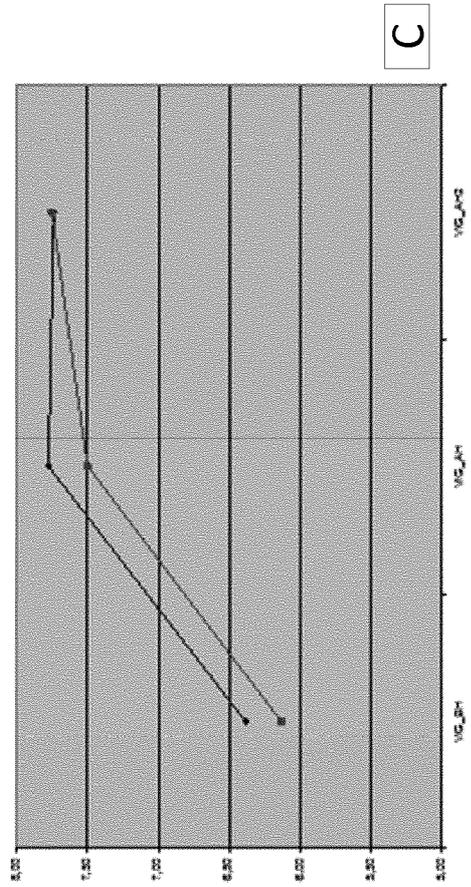
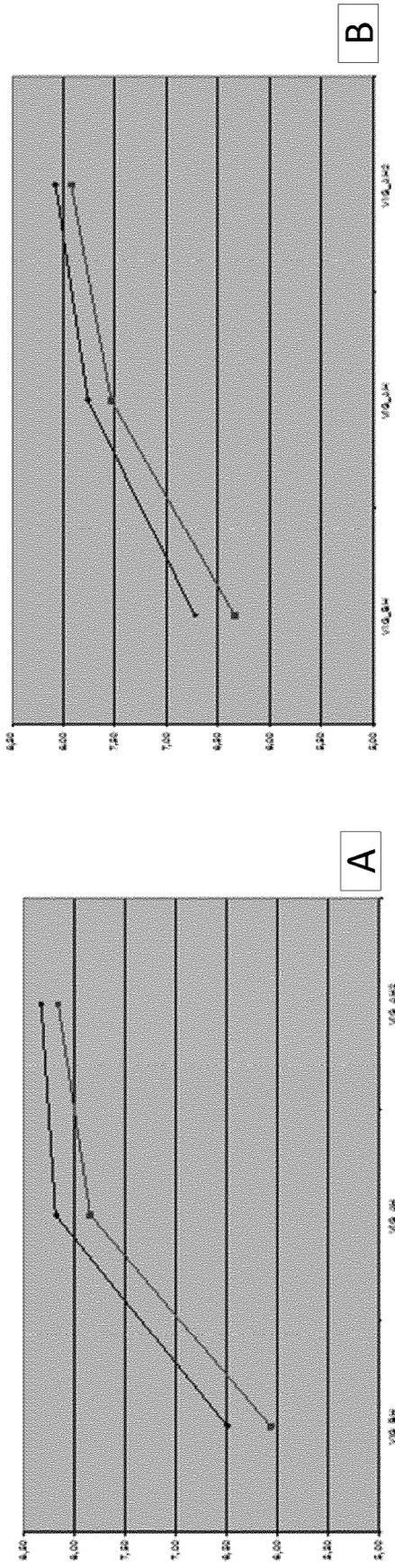


Figura 1

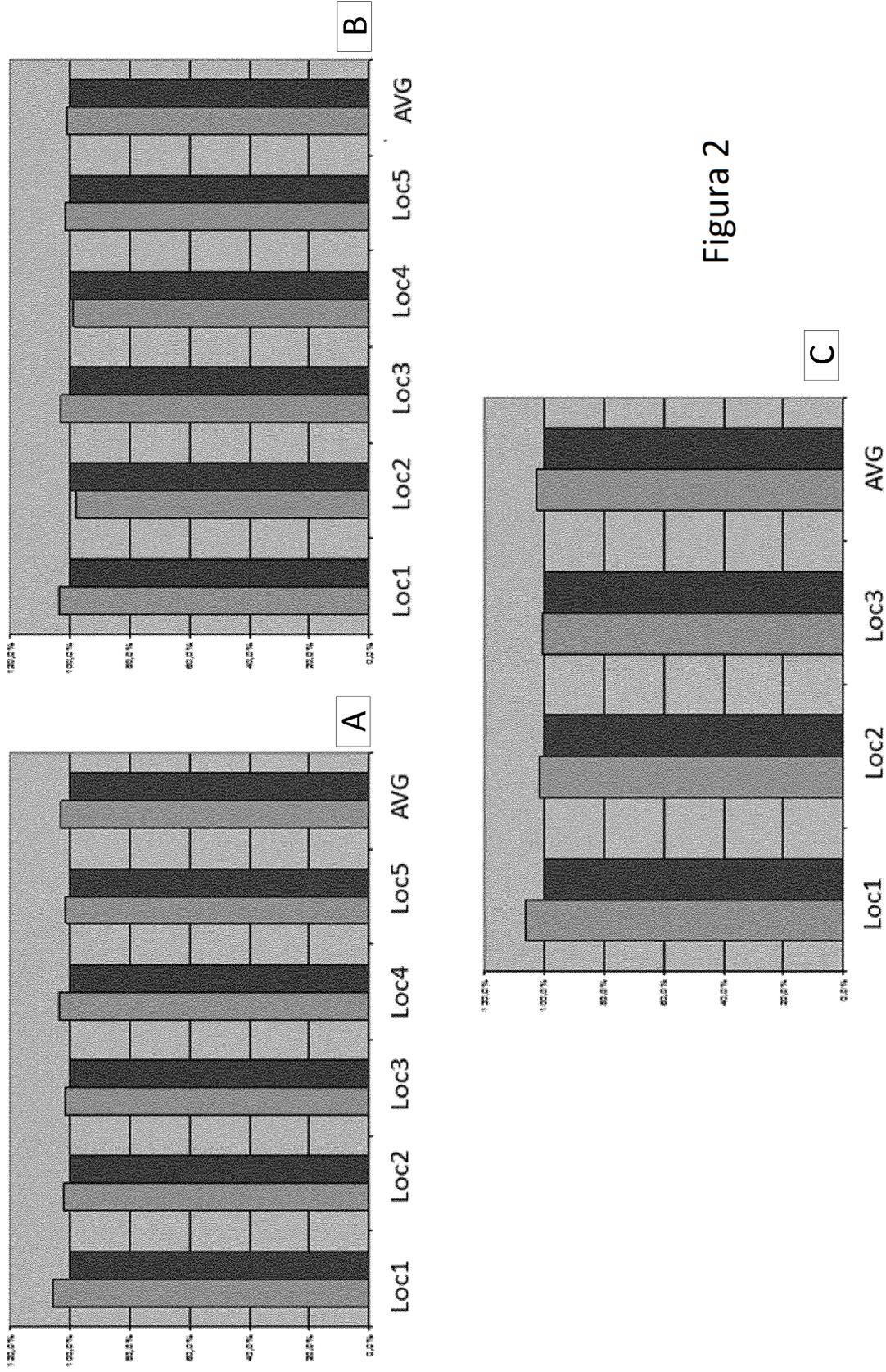


Figura 2