

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 583**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2008.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12Q 1/6895 (2008.01)

C12N 15/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2009 E 16179838 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3156488**

54 Título: **Planta Brassica que comprende un alelo indehiscente mutante**

30 Prioridad:

17.07.2008 US 135230 P
18.07.2008 EP 08075648

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2020

73 Titular/es:

**BASF AGRICULTURAL SOLUTIONS SEED US
LLC (100.0%)
100 Park Avenue
Florham Park, NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 761 583 T3

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

DESCRIPCIÓN

Planta Brassica que comprende un alelo indehiscente mutante

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la agricultura, más específicamente al uso de técnicas de biología molecular para alterar plantas de semilla dehiscente, particularmente de la familia *Brassicaceae*, en particular la especie *Brassica*, y/o acelerar la reproducción de tales plantas de semilla dehiscente. Más específicamente, la invención se refiere a procedimientos y medios mejorados para reducir el desgranado de la semilla o retrasar el desgranado de la semilla hasta después de la cosecha, en plantas tales como plantas *Brassicaceae*, particularmente plantas *Brassicaceae* cultivadas para la producción de semillas, a la vez que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. También se describen procedimientos para identificar marcadores moleculares asociados con un desgranado retrasado de las semillas en una población de plantas de semilla dehiscente. También se proporcionan procedimientos y medios para aumentar el rendimiento, particularmente el rendimiento de grano y semilla. El fenotipo de aumento de rendimiento puede estar separado del fenotipo de fragmentación de semillas reducido o retrasado.

Antecedentes de la invención

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

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

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

Se han identificados varios genes, que promueven o inhiben la dehiscencia de las vainas, en *Arabidopsis thaliana* a través del análisis de mutantes: mutantes combinados tanto en *SHATTERPROOF1* (*SHP1*; inicialmente conocido como *ACL1*) como en *SHATTERPROOF2* (*SHP2*; inicialmente conocido como *AGL5*) dan como resultado silicuas indehiscentes (es decir, silicuas que permanecen cerradas con la maduración en *Arabidopsis thaliana*) (Liljegren y col., 2000, Nature 404, 766-770). De manera similar, mutantes en el gen *INDEHISCENT* (denominado *IND1*) en

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

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

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

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

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

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

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

El documento WO 2004/113542 describe que el silenciamiento génico de ARNbc moderado de genes implicados en

el desarrollo de la zona de dehiscencia y márgenes de la valva de vainas en plantas *Brassicaceae* permite el aislamiento de líneas transgénicas con una mayor resistencia al desgranado de las vainas y un menor desgranado de las semillas, cuyas vainas, sin embargo, todavía se pueden abrir a lo largo de la zona de dehiscencia aplicando fuerzas físicas limitadas.

5 El documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052) desvela plantas *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en particular plantas de *Brassica napus*, caracterizados por que comprenden tres alelos *IND* mutantes completamente defectivos en su genoma y en los que la resistencia al desgranado de las vainas de las plantas aumenta significativamente en comparación con la resistencia al desgranado de las vainas de una planta que no comprende alelos *IND* mutantes, pero en los que la planta mantiene, preferentemente, una capacidad de trillado agrónomicamente relevante de las vainas.

10 Las invenciones descritas a continuación en las diferentes realizaciones, ejemplos y reivindicaciones proporcionan procedimientos y medios mejorados adicionales para modular las propiedades de dehiscencia en plantas de semillas dehiscentes. Más específicamente, la presente invención describe otros procedimientos y medios mejorados para reducir el desgranado de semillas o retrasar el desgranado de semillas hasta después de la cosecha, en plantas tales como plantas *Brassicaceae*, particularmente plantas *Brassicaceae* cultivadas para la producción de semillas, a la vez que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. En particular, la presente solicitud desvela plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en particular plantas de *Brassica napus*, caracterizados por que comprenden dos alelos *IND* mutantes defectivos parciales en su genoma o dos alelos *IND* mutantes defectivos parciales y dos completos y en los que la resistencia al desgranado de las vainas de las plantas aumenta significativamente en comparación con la resistencia al desgranado de las vainas de una planta que no comprende alelos *IND* mutantes, pero en los que la planta mantiene, preferentemente, una capacidad de trillado agrónomicamente relevante de las vainas. También se proporcionan procedimientos y medios para aumentar el rendimiento, particularmente el rendimiento de grano y semilla. El fenotipo de aumento de rendimiento puede estar separado del fenotipo de fragmentación de semillas reducido o retrasado.

25 **Sumario de la invención**

Los inventores han descubierto que se pueden obtener plantas de *Brassica napus* con un fenotipo de desgranado de vainas similar al de las plantas de *Brassica* descritas en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052), es decir, que combinan una mayor resistencia al desgranado de las vainas con una capacidad de trillado agrónomicamente relevante de las vainas combinando dos alelos *IND* mutantes defectivos parciales con o sin dos alelos *IND* mutantes completos defectivos en lugar de combinar tres alelos *IND* mutantes defectivos completos.

Por tanto, en el presente documento se describe una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, caracterizado porque comprende al menos dos alelos *IND* mutantes defectivos parciales en su genoma. Los genes *IND* pueden ser genes *IND-A1* o *IND-C1*. Los genes *IND* pueden comprender una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 del nucleótido en la posición 46 con el nucleótido en la posición 633, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7; y una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 del aminoácido en la posición 16 con el aminoácido en la posición 21 o la SEQ ID NO: 4. Los alelos *IND* mutantes defectivos parciales pueden ser alelos *IND* mutantes del gen *IND-C1*. Los alelos *IND* mutantes defectivos parciales pueden seleccionarse del grupo que consiste en *ind-a1-EMS06*, *ind-a1-EMS09*, *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS04*, *ind-c1-EMS08* e *ind-c1-EMS09*. La planta puede comprender además al menos un alelo *IND* mutante defectivo completo en su genoma. Los alelos *IND* mutantes defectivos completos pueden ser un alelo *IND* mutante del gen *IND-C1*. El alelo *IND* mutante defectivo completo puede seleccionarse del grupo que consiste en *ind-a1-EMS01*, *ind-a1-EMS05*, *ind-c1-EMS01* e *ind-c1-EMS03*. La planta puede ser homocigota para el alelo *IND* mutante defectivo parcial y/o completo. La planta puede producir una cantidad significativamente reducida de proteína *IND* funcional en comparación con la cantidad de proteína *IND* funcional producida por una planta correspondiente que no comprende alelos *IND* mutantes. El desgranado de la semilla de la planta puede reducirse o retrasarse significativamente en comparación con el desgranado de la semilla de una planta correspondiente que no comprende alelos *IND* mutantes. La planta puede mantener una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. La planta puede ser una planta de una especie de cultivo de *Brassica*, preferentemente *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica carinata*, *Brassica rapa* o *Brassica oleracea*. La planta puede ser una planta de una especie de semilla de aceite de *Brassica*, preferentemente *Brassica napus*, *Brassica juncea* o *Brassica rapa*.

También se describe una planta o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, que comprende al menos un alelo mutante defectivo parcial de un gen *IND* en su genoma, en el que el gen *IND* comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 del nucleótido en la posición 46 con el nucleótido en la posición 633, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7; y una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 del aminoácido en la posición 16 con el aminoácido en la posición 21 o la SEQ ID NO: 4. El alelo *IND* mutante defectivo parcial puede seleccionarse del grupo que consiste en *ind-a1-EMS06*, *ind-a1-EMS09*, *ind-a1-*

EMS13, ind-c1-EMS04, ind-c1-EMS08 e ind-c1-EMS09. El alelo *IND* mutante puede derivarse de una planta de una especie de *Brassica*. La planta puede ser una planta de una especie de *Brassica*.

También se describe una vaina de semilla obtenible a partir de las plantas descritas en el presente documento.

5 En un aspecto, se proporciona un alelo mutante defectivo parcial de un gen *IND*, en el que el gen *IND* comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 del nucleótido en la posición 46 con el nucleótido en la posición 633, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7; y una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 del aminoácido en la posición 16 con el aminoácido en la posición 21 o la SEQ ID NO: 4. En una realización, el alelo mutante se selecciona del grupo que consiste en *ind-a1-EMS06, ind-a1-EMS09, ind-a1-EMS13, ind-c1-EMS04, ind-c1-EMS08 e ind-c1-EMS09*. En otra realización, el alelo mutante deriva de una planta de una especie de *Brassica*, preferentemente de una especie de cultivo de *Brassica* o una especie de semilla oleosa de *Brassica*. En todavía un aspecto adicional, se proporciona una proteína *IND* mutante codificada por los alelos *IND* mutantes de la invención.

10

15 Incluso en un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento para identificar un alelo *IND* mutante según la invención en una muestra biológica que comprende determinar la presencia de una región específica de *IND* mutante en un ácido nucleico presente en la muestra biológica. En una realización, el procedimiento comprende además someter la muestra biológica a un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa usando un conjunto de al menos dos cebadores, estando dicho conjunto seleccionado del grupo que consiste en: un conjunto de cebadores, en el que uno de dichos cebadores reconoce específicamente la región flanqueante en 5' del alelo *IND* mutante y el otro de dichos cebadores reconoce específicamente la región flanqueante en 3' del alelo *IND* mutante, respectivamente; un conjunto de cebadores, en el que uno de dichos cebadores reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y el otro de dichos cebadores reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante; y un conjunto de cebadores, en el que uno de dichos cebadores reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y el otro de dichos cebadores reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente. El cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, respectivamente, o el cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, o el cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, en el que dichos 17 a 200 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de la mutación o las secuencias flanqueantes. El cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante puede comprender en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, respectivamente, o el cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante puede comprender en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, o el cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante puede comprender en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, en el que dichos 17 nucleótidos consecutivos localizados en 3' no derivan exclusivamente de la mutación o las secuencias flanqueantes. En otra realización adicional, el procedimiento comprende además someter la muestra biológica a un ensayo de hibridación usando un conjunto de sondas específicas que comprenden al menos una sonda específica, estando dicho conjunto seleccionado del grupo que consiste en: un conjunto de sondas específicas, en el que una de dichas sondas reconoce específicamente la región flanqueante en 5' del alelo *IND* mutante y la otra de dichas sondas reconoce específicamente la región flanqueante en 3' del alelo *IND* mutante; un conjunto de sondas específicas, en el que una de dichas sondas reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y la otra de dichas sondas reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante; un conjunto de sondas específicas, en el que una de dichas sondas reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y la otra de dichas sondas reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente; y una sonda específica que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante. La sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 13 a 1.000 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, respectivamente, o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 % con el mismo, o la sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 13 a 1.000 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un

20

25

30

35

40

45

50

55

60

80 % con el mismo, o la sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 13 a 1.000 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, respectivamente, en el que dichos 13 a 1.000 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de la mutación o las secuencias flanqueantes o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 % con el mismo. La sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante puede comprender una secuencia de nucleótidos de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, respectivamente, o la sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante puede comprender una secuencia de nucleótidos de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, o la sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante puede comprender una secuencia de nucleótidos de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, respectivamente, en el que dichos al menos 13 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de la mutación o las secuencias flanqueantes. En otra realización particular, la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 a 929 o de 931 a 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 930 de SEQ ID NO: 5 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 930 o del 930 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 995 o del 997 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 996 de SEQ ID NO: 5 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 996 o del 996 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; o la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 1035 o del 1037 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 1036 de SEQ ID NO: 5 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 1036 o del 1036 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; o la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 902 o del 904 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 903 de SEQ ID NO: 7 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 903 o del 903 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; o la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 910 o del 912 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 911 de SEQ ID NO: 7 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 911 o del 911 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; o la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 919 o del 921 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 920 de SEQ ID NO: 7 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 920 o del 920 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente. El conjunto de sondas se puede seleccionar del grupo que consiste en: un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 18; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 23 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24; y un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27.

En otro aspecto más, se proporciona un procedimiento para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante de acuerdo con la invención en una planta o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, que determina la presencia de un mutante y/o una región específica *IND* de tipo salvaje correspondiente en el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma. En una realización, el procedimiento comprende además someter el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, a un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa usando un conjunto de al menos dos o al menos tres cebadores, en el que al menos dos de dichos cebadores reconocen específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje, estando dichos al menos dos cebadores seleccionados del grupo que consiste en: un primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 3' o 5' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, respectivamente; un primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje; y un primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo

IND mutante de tipo salvaje, respectivamente; y en el que al menos dos de dichos cebadores reconocen específicamente el alelo *IND* mutante, estando dichos al menos dos cebadores seleccionados del grupo que consiste en: el primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 3' o 5' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, respectivamente; el primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del mutante del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un tercer cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante; y el primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un tercer cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente. El cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje o del complementario del mismo, respectivamente; o los cebadores que reconocen específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje o del complementario del mismo, respectivamente; o los cebadores que reconocen específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje, puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o salvaje o del complementario del mismo, respectivamente, en el que dichos 17 a 200 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de la región de mutación o de las secuencias flanqueantes. El cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje puede comprender en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje o del complementario del mismo, respectivamente; o los cebadores que reconocen específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje puede comprender en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje o del complementario del mismo, respectivamente; o los cebadores que reconocen específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje pueden comprender en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje o del complementario del mismo, respectivamente, en el que dichos 17 nucleótidos consecutivos localizados en 3' no derivan exclusivamente del sitio o región de mutación o de las secuencias flanqueantes. En aún una realización adicional, el procedimiento comprende además someter el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, a un ensayo de hibridación usando un conjunto de al menos dos sondas específicas, en el que al menos una de dichas sondas específicas reconoce específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje, dicha al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en: una primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y una segunda sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 3' o 5' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, respectivamente; una primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y una segunda sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje; una primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y una segunda sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante de tipo salvaje, respectivamente; y una sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante; y en el que al menos una de dichas sondas específicas reconoce específicamente el alelo *IND* mutante, dicha al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en: la primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y la segunda sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 3' o 5' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, respectivamente; la primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del mutante del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y una tercera sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante; la primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y una tercera sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante; y una sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante. La sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 13 a 1.000 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje o del complementario del mismo, respectivamente, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma, o la sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 13 a 1.000 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje, respectivamente, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma, o la sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje puede consistir en una secuencia de nucleótidos 13 a 1.000 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje, respectivamente, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma, en el que dichos 13 a 1.000 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente del sitio o región de mutación o de las secuencias flanqueantes. La sonda que reconoce específicamente la región flanqueante

en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje puede comprender una secuencia de nucleótidos de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje o del complementario del mismo, respectivamente, o la sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje puede comprender una secuencia de nucleótidos de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje del complementario del mismo, o la sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje puede comprender una secuencia de nucleótidos de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o de tipo salvaje del complementario del mismo, respectivamente, en el que dichos al menos 13 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de la mutación o las secuencias flanqueantes. La región flanqueante en 5' o 3' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 929 o del 931 al 1.622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia de nucleótidos del nucleótido 930 de la SEQ ID NO: 5 o de la complementaria de del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia a o la complementaria de la misma; dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 930 o del 930 al 1622 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 929 seguido de a o a seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 931 al 1622 o de la complementaria del mismo, respectivamente; o la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 995 o del 997 al 1622 o la complementaria del mismo, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia de nucleótidos del nucleótido 996 de la SEQ ID NO: 5 o de la complementaria de del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia a o la complementaria de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 996 o del 996 al 1622 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 995 seguido de a o a seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 997 al 1622 o de la complementaria del mismo, respectivamente; o la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 1035 o del 1037 al 1622 o la complementaria del mismo, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia de nucleótidos del nucleótido 1036 de la SEQ ID NO: 5 o de la complementaria de del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia t o la complementaria de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 1036 o del 1036 al 1622 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 1035 seguido de t o t seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1037 al 1622 o de la complementaria del mismo, respectivamente; o la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 902 o del 904 al 1593 o la complementaria de la misma, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia de nucleótidos del nucleótido 903 de la SEQ ID NO: 7 o de la complementaria de la misma; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia t o la complementaria de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 903 o del 903 al 1593 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 902 seguido de t o t seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 904 al 1593 o de la complementaria del mismo, respectivamente; o la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 910 o del 912 al 1593 o la complementaria de la misma, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia de nucleótidos del nucleótido 911 de la SEQ ID NO: 7 o de la complementaria de del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia a o la complementaria de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 911 o del 911 al 1593 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 910 seguido de a o a seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 912 al 1593 o de la complementaria del mismo, respectivamente; o la región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 919 o del 921 al 1593 o la complementaria de la misma, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje puede tener la secuencia de nucleótidos del nucleótido 920 de la SEQ ID NO: 7 o de la complementaria de del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia t o la complementaria de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 920 o del 920 al 1.593 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 919 seguido de t o t seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 921 al 1593 o de la complementaria del mismo, respectivamente. Adecuado es un conjunto de al menos tres sondas específicas seleccionadas del grupo que consiste en: un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO:11, una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO:14, una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16; un

conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO:17, una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 18 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO:20, una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22; un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO:23, una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25; y un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO:26, una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28.

También se proporcionan kits para identificar un alelo *IND* mutante de acuerdo con la invención en una muestra biológica y kits para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante de acuerdo con la invención en una planta o célula, parte, semilla o progenie de la misma, que comprende los cebadores o sondas como se ha descrito anteriormente. También se describen procedimientos para combinar los alelos *IND* mutantes de acuerdo con la invención en una planta, procedimientos para transferir los alelos *IND* mutantes de acuerdo con la invención de una planta a otra planta, y procedimientos para hacer una planta o semilla (híbrida) según la invención.

En otra realización de la invención, los alelos *IND* mutantes de la invención se usan para aumentar el rendimiento de semillas o granos cosechados de plantas de *Brassica*. El aumento del rendimiento puede ser una consecuencia de la reducción o retraso del desgranado de las semillas, pero también puede ser independiente del desgranado de semillas reducido o retrasado. En particular, se describen plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, caracterizado porque estas plantas comprenden en su genoma dos alelos *IND* homocigotos mutantes como se describe en el presente documento.

Definiciones generales

"Aumento de la resistencia al desgranado de las vainas" y "reducción del desgranado de las semillas", tal como se usan en el presente documento, se refiere a una disminución de la tendencia al desgranado de semillas y/o un retraso en el momento del desgranado de semillas, en particular hasta después de la cosecha, de plantas de *Brassica*, cuyos frutos normalmente no maduran de forma sincrónica, sino secuencialmente, de modo que algunas vainas se abren y desgranar sus semillas antes o durante la cosecha. El nivel de resistencia al desgranado de las vainas se correlaciona positivamente y, por ejemplo, puede medirse determinando la fuerza necesaria para romper las vainas en la "prueba de separación por tracción" (Davies y Bruce, 1997, J Mat Sci 32: 5895-5899; Morgan y col., 1998, Fields Crop Research 58, 153-165), el número de vainas intactas restantes después de, por ejemplo, 20 segundos ("IP20"; Morgan y col., 1998, *citado anteriormente*), 9,7 o 17 segundos (Bruce y col., 2002, Biosystems Eng 81 (2): 179-184) en una "prueba de impacto aleatorio", la semivida de la muestra de vainas (en lo sucesivo, también denominada "LD50") en una prueba de impacto aleatorio, es decir, el tiempo de tratamiento necesario para provocar la apertura del 50 % de las vainas en las muestras de vainas analizadas y la "puntuación de campo para el desgranado" (Morgan y col., 1998, *citado anteriormente*). Bruce y col., 2002 (citado anteriormente, Morgan y col., 1998 (citado anteriormente y los ejemplos siguientes han descrito pruebas de impacto aleatorias (RIT) y algoritmos para definir la semivida de la muestra de vainas en tales RIT. Brevemente, se coloca una muestra de vainas maduras intactas en un tambor cerrado junto con bolas de acero y el tambor se agita enérgicamente durante períodos de tiempo crecientes (por ejemplo, 10 s, 20 s, 40 s, 80 s). Después de cada período, se abre el tambor y se cuenta el número de vainas rotas y dañadas. La estimación más precisa del nivel de resistencia al desgranado para cada línea se calcula ajustando una curva lineal x lineal a todos los datos disponibles y estimando el tiempo necesario para romper la mitad de las vainas dentro de una muestra ("semivida de la muestra de vainas "o" LD50 "). Sin embargo, es importante que las vainas se abran principalmente a lo largo de la zona de dehiscencia y no simplemente se pulverizan, como puede ocurrir con vainas indehiscentes.

Un "aumento agrónomicamente relevante de la resistencia al desgranado de vainas", tal como se usan en el presente documento, se refiere a un aumento de la resistencia al desgranado de vainas en una planta que resulta en pérdidas de rendimiento relacionadas con el desgranado de vainas en el campo (antes de la cosecha) por debajo de las observadas normalmente para esa planta en el campo. Para la colza, se informa de que las pérdidas de rendimiento relacionadas con el desgranado de vainas en el campo son de aproximadamente el 11 % para una temporada con, de media, buenas condiciones de crecimiento y aproximadamente el 25 % para una temporada con, de media, malas condiciones de crecimiento. Se ha descubierto una correlación positiva entre estos niveles de pérdida de semillas y el nivel de pérdida de semillas a los 9,7 s y el tiempo de tratamiento de 17 s, respectivamente, en la prueba de impacto aleatorio descrita por Bruce y col., 2002 (Biosystems Eng 81 (2): 179-184). Como alternativa, para determinar si el nivel de resistencia al desgranado de vainas en una planta es agrónomicamente relevante, la semivida de la muestra de vaina ("LD50", véase en lo que antecede) de la planta se puede comparar con la semivida de la muestra de vaina de una planta que se sabe que tiene un nivel promedio de resistencia al desgranado de la vaina, tal como, para colza, todas las variedades de colza comercialmente disponibles actualmente.

Como se emplea en el presente documento, "mal desgranado de vainas o semillas" o "dehiscencia de frutas o vainas" se refiere a un procedimiento que tiene lugar en una fruta después de la maduración de las semillas, por lo que las válvulas se desprenden del tabique central liberando las semillas. La región que se rompe (es decir, la "zona de dehiscencia") recorre toda la longitud del fruto entre las válvulas y el replum (tabique externo). En la madurez, la "zona de dehiscencia" es esencialmente una capa de células no lignificadas entre una región de células lignificadas en la válvula y el replum. El desgranado se produce debido a la combinación del aflojamiento de la pared celular en la zona

de dehiscencia y las tensiones establecidas por las propiedades mecánicas diferenciales de las células de secado en la silicua.

Un "fruto" de *Brassica*, tal como se usan en el presente documento, se refiere a un órgano de una planta de *Brassica* que se desarrolla a partir de un gineceo compuesto por carpelos fusionados, que, tras la fertilización, crece para convertirse en una "vainita (semilla)" o "silicua" que contiene las semillas en desarrollo. Una "vainita" ("semilla") o "silicua" de *Brassica* consiste en una pared de fruto (carpelo) que encierra dos lóbulos separados por el tabique. Las "zonas de dehiscencia" se desarrollan en los márgenes del carpelo adyacentes al tabique y se extienden a lo largo de la silicua. Las células de la zona de dehiscencia eventualmente comienzan a degradarse y esto debilita el contacto entre las paredes o válvulas del carpelo y el tabique. La pérdida de cohesión celular está confinada a las células de la zona de dehiscencia y es el resultado de la rotura de la lámina media (Meakin y Roberts, 1990, J Exp Bot 41, 995-1011).

"Zonas de dehiscencia", tal como se usan en el presente documento, se refiere a capas de simples, células parenquimatosas, contenidas en las suturas situadas a ambos lados de la vaina bivalva de plantas, en particular plantas de *Brassica*. Las zonas de dehiscencia están situadas entre el borde de la valva de la vaina y un replum central que contiene el haz vascular principal del pedúnculo o pedicelo. La disociación de las células en la zona de dehiscencia tiene lugar durante la senescencia de las vainas y se completa cuando las vainas alcanzan la madurez completa (Meakin y Roberts, 1990, *citado anteriormente*). Se puede producir separación de la valva. La zona de dehiscencia contiene trazas vasculares, que pasan de la pared de la vaina al pedicelo (tallo) y el replum. El procedimiento de degradación de la vaina se lleva a cabo solo después de que la fuerza externa fractura los delicados hilos vasculares, permitiendo que las valvas se separen y las semillas caigan al suelo. Esto ocurre durante la perturbación de la canopia, por ejemplo por contacto con la cosechadora durante la cosecha. El tejido vascular contiene células lignificadas engrosadas, que forman los grupos de células colenquimatosas que se encuentran adyacentes a las células conductoras (Meakin y Roberts, 1990, *citado anteriormente*). Esto proporciona rigidez al tejido y, presumiblemente, cierta resistencia a la fractura.

Como se emplea en el presente documento, "una capacidad de trillado agrónomicamente relevante" se refiere a la resistencia de una vaina, particularmente una vaina de colza, a la apertura a lo largo de la zona de dehiscencia de la vaina con la liberación concurrente de las semillas, tras la aplicación de fuerzas físicas que permiten la apertura completa de las vainas mientras previenen el daño a las semillas, como se usan, por ejemplo, en una cosechadora combinada. Se ha descubierto una correlación positiva entre la semivida de una muestra de vaina ("LD50") en una prueba de impacto aleatorio y su capacidad de trillado. Las semividas de la muestra de vainas de colza, según lo determinado en un RIT realizado como se describe en los Ejemplos, que corresponden a la capacidad de trillado agrónomicamente relevante, no debe exceder los 80 segundos. Los valores típicos de la semivida de la muestra para las líneas de control de variedades de colza comercialmente disponibles son aproximadamente 10 segundos. Por tanto, las líneas con resistencia al desgranado de vainas significativamente aumentada con capacidad de trillado agrónomicamente relevante tienen una semivida de la muestra de vainas en RIT entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80 segundos, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70 segundos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 70 segundos, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 segundos, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 segundos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60 segundos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 segundos, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 segundos, de aproximadamente 57 segundos.

"Planta de semillas dehiscentes" significa una planta que produce un fruto seco dehiscente, que tiene paredes de fruto que se abren para permitir el escape de las semillas que contiene. Los frutos dehiscentes habitualmente contienen varias semillas e incluyen las frutas conocidas, por ejemplo, como legumbres, cápsulas y silicuas.

"Planta de cultivo" se refiere a especies de plantas cultivadas como cultivo, tal como *Brassica napus* (AACC, $2n = 38$), *Brassica juncea* (AABB, $2n=36$), *Brassica carinata* (BBCC, $2n=34$), *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*) (AA, $2n=20$), *Brassica oleracea* (CC, $2n=18$) o *Brassica nigra* (BB, $2n=16$). La definición no abarca las malezas, tal como *Arabidopsis thaliana*.

La expresión "secuencia de ácido nucleico" (o molécula de ácido nucleico) se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma monocatenaria o bicatenaria, particularmente un ADN que codifica una proteína o fragmento de proteína de acuerdo con la invención. Una "secuencia de ácido nucleico endógeno" se refiere a una secuencia de ácido nucleico dentro de una célula vegetal, por ejemplo, un alelo endógeno de un gen *IND* presente en el genoma nuclear de una célula de *Brassica*. Una "secuencia de ácido nucleico aislada" se utiliza para hacer referencia a una secuencia de ácido nucleico que ya no está en su entorno natural, por ejemplo *in vitro* o en una célula huésped bacteriana o vegetal recombinante.

El término "gen" significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo, en un pre-ARNm, que comprende secuencias de intrones, que luego se cortan y empalman en un ARNm maduro, o directamente en un ARNm sin secuencias de intrones) en una célula, unido operativamente a regiones reguladoras (por ejemplo, un promotor). Por lo tanto, un gen puede comprender varias secuencias unidas operativamente, tal como un promotor, una secuencia líder en 5' que comprende, por ejemplo, secuencias involucradas en el inicio de la traducción, una región codificante (de proteínas) (ADNc o ADN genómico) y una secuencia en 3' no traducida que comprende, por ejemplo, sitios de terminación de la transcripción. "Gen

endógeno" se utiliza para diferenciarse de un "gen extraño", "transgén" o "gen quimérico", y se refiere a un gen de una planta de un determinado género vegetal, especie o variedad, que no se ha introducido en esa planta por transformación (es decir, no es un "transgén"), pero que normalmente está presente en plantas de ese género, especie o variedad, o que se introduce en esa planta a partir de plantas de otro género vegetal, especie o variedad, en el que normalmente está presente, por técnicas normales de reproducción o por hibridación somática, por ejemplo, por fusión de protoplastos. De manera similar, un "alelo endógeno" de un gen no se introduce en una planta o tejido vegetal mediante transformación vegetal, pero es, por ejemplo, generado por mutagénesis y/o selección de plantas u obtenido mediante el rastreo de poblaciones naturales de plantas.

"Expresión de un gen" o "expresión génica" se refiere al procedimiento en el que una región de ADN, que está unida operativamente a las regiones reguladoras apropiadas, particularmente un promotor, se transcribe en una molécula de ARN. La molécula de ARN se procesa luego (por procedimientos postranscripcionales) dentro de la célula, por ejemplo, por corte y empalme de ARN e inicio de traducción y traducción en una cadena de aminoácidos (proteína), y terminación de la traducción por codones de terminación de la traducción. La expresión "funcionalmente expresado" se usa en el presente documento para indicar que se produce una proteína funcional; la expresión "no expresado funcionalmente" para indicar que se produce una proteína con funcionalidad significativamente reducida o sin funcionalidad (actividad biológica) o que no se produce proteína (véase más adelante).

El término "proteína" se refiere a una molécula que consiste en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo de acción específico, el tamaño, estructura tridimensional u origen. Un "fragmento" o "porción" de una proteína puede, por tanto, seguir denominándose "proteína". Una "proteína aislada" se usa para hacer referencia a una proteína que ya no está en su ambiente natural, por ejemplo *in vitro* o en una célula huésped bacteriana o vegetal recombinante. Los "aminoácidos" son los principales bloques componentes de las proteínas y enzimas. Se incorporan a las proteínas mediante ARN de transferencia de acuerdo con el código genético, mientras que los ribosomas decodifican el ARN mensajero. Durante y después del ensamblaje final de una proteína, el contenido de aminoácidos dicta las propiedades espaciales y bioquímicas de la proteína o enzima. La cadena principal de aminoácidos determina la secuencia primaria de una proteína, pero la naturaleza de las cadenas laterales determina las propiedades de la proteína. "Aminoácidos similares", tal como se usan en el presente documento, se refiere a aminoácidos que tienen cadenas laterales de aminoácidos similares, es decir, aminoácidos que tienen cadenas laterales polares, no polares o prácticamente neutras. "Aminoácidos no similares", tal como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos que tienen diferentes cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, un aminoácido con una cadena lateral polar no es similar a un aminoácido con una cadena lateral no polar. Las cadenas laterales polares generalmente tienden a estar presentes en la superficie de una proteína donde pueden interactuar con el ambiente acuoso que se encuentra en las células (aminoácidos "hidrofílicos"). Por otro lado, los aminoácidos "no polares" tienden a residir dentro del centro de la proteína donde pueden interactuar con vecinos no polares similares (aminoácidos "hidrofóbicos"). Ejemplos de aminoácidos que tienen cadenas laterales polares son arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina (todos hidrofílicos, excepto la cisteína, que es hidrofóbica). Ejemplos de aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares son alanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina y triptófano (todos hidrofóbicos, excepto la glicina que es neutra).

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

El término "gen *IND*" se refiere en el presente documento a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína INDEHISCENTE (IND), que es un factor básico de transcripción del dominio hélice-bucle-hélice (bHLH) requerido para la dispersión de semillas (Liljegren y col., 2004, Cell 116: 843-853).

Como se emplea en el presente documento, el término "alelo(s)" significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen en un locus particular. En una célula diploide (o anfídiploide) de un organismo, los alelos de un gen dado se encuentran en una ubicación específica o locus (loci plural) en un cromosoma. Un alelo está presente en cada cromosoma del par de cromosomas homólogos.

Como se emplea en el presente documento, la expresión "cromosomas homólogos" significa cromosomas que contienen información para las mismas características biológicas y contienen los mismos genes en los mismos loci pero posiblemente diferentes alelos de esos genes. Los cromosomas homólogos son cromosomas que se emparejan durante la meiosis. "Cromosomas no homólogos", que representan todas las características biológicas de un organismo, forman un conjunto, y el número de conjuntos en una celda se llama ploidía. Los organismos diploides contienen dos conjuntos de cromosomas no homólogos, en los que cada cromosoma homólogo se hereda de un padre

diferente. En especies anfidiplóides, existen esencialmente dos conjuntos de genomas diploides, por lo que los cromosomas de los dos genomas se denominan "cromosomas homólogos" (y, de manera similar, los loci o genes de los dos genomas se denominan loci o genes homólogos). Una especie vegetal diploide o anfidiplóide puede comprender una gran cantidad de alelos diferentes en un locus particular.

- 5 Como se emplea en el presente documento, el término "heterocigoto" significa una condición genética que existe cuando dos alelos diferentes residen en un locus específico, pero se posicionan individualmente en pares correspondientes de cromosomas homólogos en la célula. A la inversa, tal como se usa en el presente documento, el término "homocigoto" significa una condición genética que existe cuando dos alelos idénticos residen en un locus específico, pero se posicionan individualmente en pares correspondientes de cromosomas homólogos en la célula.
- 10 Como se emplea en el presente documento, el término "locus" (loci plural) significa un lugar o lugares específicos o un sitio en un cromosoma donde, por ejemplo, se encuentra un gen o marcador genético. Por ejemplo, el "locus *IND-A1*" se refiere a la posición en un cromosoma del genoma A donde se puede encontrar el gen *IND-A1* (y dos alelos *IND-A1*), mientras que el "locus *IND-C1*" se refiere a la posición en un cromosoma del genoma C donde se puede encontrar el gen *IND-C1* (y dos alelos *IND-C1*).
- 15 Siempre que se haga referencia a una "planta" o "plantas" según la invención, se entiende que el presente documento también abarca partes de plantas (células, tejidos u órganos, vainas de semillas, semillas, partes cortadas, tales como raíces, hojas, flores, polen, etc.), progenie de las plantas que conservan las características distintivas de los padres (especialmente las propiedades de dehiscencia del fruto), tales como semillas obtenidas por autofecundación o cruzamiento, por ejemplo, semilla híbrida (obtenida cruzando dos líneas parentales endogámicas), plantas híbridas y partes de plantas derivadas de las mismas, a menos que se indique de otro modo.

Un "ensayo molecular" (o prueba) se refiere en el presente documento a un ensayo que indica (directa o indirectamente) la presencia o ausencia de uno o más alelos *IND* particulares en uno o ambos loci *IND* (por ejemplo, en uno o ambos loci *IND-A1* o *IND-C1*). En una realización, permite determinar si un alelo *IND* particular (tipo salvaje o mutante) es homocigoto o heterocigoto en el locus en cualquier planta individual.

- 25 "Tipo salvaje" (también escrito "de tipo salvaje" o "tipo salvaje"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a una forma típica de una planta o un gen como se produce más habitualmente en la naturaleza. Una "planta de tipo salvaje" se refiere a una planta con el fenotipo más habitual de dicha planta en la población natural. Un "alelo de tipo salvaje" se refiere a un alelo de un gen requerido para producir el fenotipo de tipo salvaje. Por el contrario, una "planta mutante" se refiere a una planta con un fenotipo raro diferente de dicha planta en la población natural o producida por intervención humana, por ejemplo, por mutagénesis, y un "alelo mutante" se refiere a un alelo de un gen requerido para producir el fenotipo mutante.

- Como se emplea en el presente documento, el término "*IND* de tipo salvaje" (por ejemplo, *IND-A1* o *IND-C1* de tipo salvaje) significa un alelo *IND* de origen natural que se encuentra dentro de las plantas, en particular plantas de *Brassicaceae*, especialmente plantas de *Brassica*, que codifica una proteína *IND* funcional (por ejemplo, un *IND-A1* o *IND-C1* funcional, respectivamente). Por el contrario, el término "*IND* mutante" (por ejemplo, mutante *IND-A1* o *IND-C1*), como se usa en el presente documento, se refiere a un alelo *IND*, que no codifica una proteína *IND* funcional, es decir, un alelo *IND* que codifica una proteína *IND* no funcional (por ejemplo, una *IND-A1* o *IND-C1* no funcional, respectivamente), que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína *IND* que no tiene actividad biológica o una actividad biológica significativamente reducida en comparación con la proteína *IND* funcional de tipo salvaje correspondiente, o que no codifica ninguna proteína *IND* en absoluto. Un alelo *IND* mutante "defectivo completo" o "nulo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un alelo *IND* mutante, que codifica una proteína *IND* que no tiene actividad biológica en comparación con la proteína *IND* funcional de tipo salvaje correspondiente o que no codifica ninguna proteína en absoluto. Tal como un "alelo *IND* mutante defectivo completo" es, por ejemplo, un alelo *IND* de tipo salvaje, que comprende una o más mutaciones en su secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, una o más mutaciones sin sentido o de sentido erróneo. En particular, dicho alelo *IND* mutante defectivo completo es un alelo *IND* de tipo salvaje, que comprende una mutación que, preferentemente, da como resultado la producción de una proteína *IND* que carece de al menos un dominio funcional, tal como el dominio de activación, el dominio de unión al ADN y/o el dominio de dimerización, o que carece de al menos un aminoácido crucial para su función, tal como un aminoácido crucial para la unión al ADN, por ejemplo, la arginina en la posición 127 en la SEQ ID NO: 2 o en la posición 140 en la SEQ ID NO: 4 y similares, o la glutamina en la posición 122 en la SEQ ID NO: 2 o en la posición 135 en la SEQ ID NO: 4 y similares, de forma tal que la actividad biológica de la proteína *IND* está completamente anulada o de modo que la(s) mutación(es) dan como resultado, preferentemente, la ausencia de producción de una proteína *IND*. Un alelo *IND* mutante "defectivo parcial", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un alelo *IND* mutante, que codifica una proteína *IND* que tiene una actividad biológica significativamente reducida en comparación con la proteína *IND* funcional de tipo salvaje correspondiente. Tal "alelo *IND* mutante defectivo parcial" es, por ejemplo, una alelo *IND* de tipo salvaje, que comprende una o más mutaciones en su secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, una o más mutaciones de sentido erróneo. En particular, dicho alelo *IND* mutante defectivo parcial es un alelo *IND* de tipo salvaje, que comprende una mutación que, preferentemente, da como resultado la producción de una proteína *IND* en la que al menos un aminoácido conservado y/o funcional está sustituido por otro aminoácido, tal que la actividad biológica se reduce significativamente pero no se elimina por completo. Tal alelo *IND* mutante defectivo total o parcial también puede codificar una proteína *IND* negativa dominante, que es capaz

de afectar negativamente a la actividad biológica de otras proteínas IND dentro de la misma célula. Tal proteína IND negativa dominante puede ser una proteína IND que todavía es capaz de interactuar con los mismos elementos que la proteína IND de tipo salvaje, pero bloquea algún aspecto de su función. Ejemplos de proteínas IND negativas dominantes son las proteínas IND que carecen del dominio de activación y/o dominio de dimerización o restos de aminoácidos específicos cruciales para la activación y/o dimerización, pero aún contienen el dominio de unión al ADN, de modo que no solo se reduce o elimina su propia actividad biológica, sino que reducen aún más la actividad total de IND en la célula al competir con las proteínas IND de tipo salvaje y/o defectivas parciales presentes en la célula por los sitios de unión al ADN. Otros ejemplos de proteínas IND negativas dominantes son las proteínas IND que carecen del dominio de activación y/o el dominio de unión al ADN o los restos de aminoácidos específicos cruciales para la activación y/o la unión al ADN, pero aún contienen el dominio de dimerización, de modo que no solo se reduce o elimina su propia actividad biológica, sino que reducen aún más la actividad IND total en la célula produciendo dímeros proteicos que carecen de al menos un dominio funcional. Los alelos mutantes pueden ser secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína IND se designan como "*ind*" (por ejemplo, *ind-a1* o *ind-c1*, respectivamente) en el presente documento. Los alelos mutantes pueden ser alelos "mutantes naturales", que son alelos mutantes encontrados en la naturaleza (por ejemplo, producidos espontáneamente sin la aplicación humana de mutágenos) o alelos "mutantes inducidos", que son inducidos por la intervención humana, por ejemplo, por mutagénesis.

Una "cantidad significativamente reducida de proteína IND funcional" (por ejemplo, proteína IND-A1 o IND-C1 funcional) se refiere a una reducción en la cantidad de una proteína IND funcional producida por la célula que comprende un alelo *IND* mutante en al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % (es decir, la célula no produce proteína IND funcional) en comparación con la cantidad de proteína IND funcional producida por la célula que no comprende el alelo *IND* mutante. Esta definición abarca la producción de una proteína IND "no funcional" (por ejemplo, proteína IND truncada) que no tiene actividad biológica *in vivo*, la reducción en la cantidad absoluta de la proteína IND funcional (por ejemplo, no se produce proteína IND funcional debido a la mutación en el gen *IND*), la producción de una proteína IND con actividad biológica significativamente reducida en comparación con la actividad de una proteína IND de tipo salvaje funcional (tal como una proteína IND en la que uno o más restos de aminoácidos que son cruciales para la actividad biológica de la proteína IND codificada, como se ejemplifica a continuación, son sustituidos por otro resto de aminoácido) y/o el efecto adverso de las proteínas IND negativas dominantes sobre otras proteínas IND funcionales y/o parcialmente funcionales.

El término "proteína IND mutante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína IND codificada por una secuencia de ácido nucleico *IND* mutante ("alelo *ind*") mediante la cual la mutación da como resultado una actividad de IND significativamente reducida y/o nula *in vivo*, en comparación con la actividad de la proteína IND codificada por una secuencia *IND* no mutante, de tipo salvaje ("alelo IND").

"Mutagénesis", tal como se usa en el presente documento, se refiere al procedimiento en el que las células vegetales (por ejemplo, una pluralidad de semillas de *Brassica* u otras partes, tal como polen, etc.) se someten a una técnica que induce mutaciones en el ADN de las células, tal como el contacto con un agente mutagénico, tal como una sustancia química (tal como etilmetilsulfonato (EMS), etilnitrosourea (ENU), etc.) o radiación ionizante (neutrones (tal como en la mutagénesis de neutrones rápidos, etc.), rayos alfa, rayos gamma (tal como el suministrado por una fuente de cobalto 60), rayos X, radiación UV, etc.), o una combinación de dos o más de estos. Por tanto, la mutagénesis deseada de uno o más alelos *IND* puede lograrse mediante el uso de medios químicos tales como el contacto de uno o más tejidos vegetales con etilmetilsulfonato (EMS), etilnitrosourea, etc., mediante el uso de medios físicos, tales como rayos X, etc., o por radiación gamma, TAL como el suministrado por una fuente de cobalto 60. Si bien las mutaciones creadas por irradiación suelen ser deleciones grandes u otras lesiones grandes, tal como translocaciones o reordenamientos complejos, las mutaciones creadas por mutágenos químicos a menudo son lesiones más discretas, tales como mutaciones puntuales. Por ejemplo, el EMS alquila bases de guanina, lo que resulta en un mal emparejamiento de bases: una guanina alquilada se emparejará con una base de timina, lo que da como resultado principalmente transiciones de G/C a A/T. Después de la mutagénesis, las plantas de *Brassica* se regeneran a partir de las células tratadas utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, las semillas de *Brassica* resultantes se pueden plantar de acuerdo con los procedimientos de cultivo convencionales y después de la autopolinización se forma la semilla en las plantas. Como alternativa, las plántulas haploides duplicadas se pueden extraer para formar inmediatamente plantas homocigotas, por ejemplo, como describen Coventry y col., (1988, Manual for Microspore Culture Technique for *Brassica napus*. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. de Guelph, Guelph, Ontario, Canadá). La semilla adicional que se forma como resultado de tal autopolinización en el presente o en una generación posterior puede cosecharse y seleccionarse para detectar la presencia de alelos *IND* mutantes. Se conocen varias técnicas para detectar alelos mutantes específicos, por ejemplo, Deleteagene™ (Delete-a-gene; Li y col., 2001, Plant J 27: 235-242) utiliza ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar mutantes por deleción generadas por mutagénesis de neutrones rápidos, TILLING (lesiones locales inducidas dirigidas en genomas; McCallum y col., 2000, Nat Biotechnol 18: 455-457) identifica mutaciones puntuales inducidas por EMS, etc. En los ejemplos siguientes se describen técnicas adicionales para detectar la presencia de alelos *IND* mutantes específicos.

Como se emplea en el presente documento, la expresión "de origen no natural" o "cultivado" cuando se usa en referencia a una planta, significa una planta con un genoma que ha sido modificado por el hombre. Una planta transgénica, por ejemplo, es una planta de origen no natural que contiene una molécula de ácido nucleico exógena, por ejemplo, un gen quimérico que comprende una región transcrita que cuando se transcribe produce una molécula

de ARN biológicamente activa capaz de reducir la expresión de un gen endógeno, tal como un gen IND y, por tanto, ha sido genéticamente modificado por el hombre. Además, una planta que contiene una mutación en un gen endógeno, por ejemplo, una mutación en un gen IND endógeno, (por ejemplo, en un elemento regulador o en la secuencia de codificación) como resultado de una exposición a un agente mutagénico también se considera una planta no natural, ya que ha sido genéticamente modificado por el hombre. Asimismo, una planta de una especie particular, tal como *Brassica napus*, que contiene una mutación en un gen endógeno, por ejemplo, en un gen IND endógeno, que en la naturaleza no ocurre en esa especie de planta en particular, como resultado de, por ejemplo, procedimientos de reproducción dirigidos, tal como la reproducción y selección asistida por marcadores o la introgresión, con una planta de la misma u otra especie, tal como *Brassica juncea* o *rapa*, de esa planta también se considera una planta de origen no natural. Por el contrario, una planta que contiene solo mutaciones espontáneas o naturales, es decir, una planta que no ha sido genéticamente modificada por el hombre, no es una "planta que no es de origen natural" como se define en el presente documento y, por tanto, no está incluida en la invención. Un experto en la materia entiende que, mientras que una planta de origen no natural suele tener una secuencia de nucleótidos alterada en comparación con una planta de origen natural, una planta de origen no natural también puede ser modificada genéticamente por el hombre sin alterar su secuencia de nucleótidos, por ejemplo, modificando su patrón de metilación.

El término "ortólogo" de un gen o proteína se refiere en el presente documento al gen o proteína homólogo encontrado en otra especie, que tiene la misma función que el gen o la proteína, pero es (generalmente) divergente en secuencia desde el momento en que las especies que albergan los genes divergieron (es decir, los genes evolucionaron de un ancestro común por especiación). Por lo tanto, los ortólogos de los genes IND de *Brassica napus* pueden identificarse en otras especies de plantas (por ejemplo, *Brassica juncea*, etc.) según ambas comparaciones de secuencias (por ejemplo, en función de porcentajes de identidad de secuencia sobre la secuencia completa o sobre dominios específicos) y/o análisis funcional.

En el presente documento se usa una "variedad" de conformidad con el convenio de la UPOV y se refiere a una agrupación de plantas dentro de un taxón botánico único del rango más bajo conocido, agrupación que puede definirse por la expresión de las características resultantes de un genotipo dado o una combinación de genotipos, puede distinguirse de cualquier otra agrupación de plantas por la expresión de al menos una de dichas características y se considera como una unidad con respecto a su idoneidad para propagarse sin cambios (estable).

El término "que comprende" debe interpretarse como que especifica la presencia de las partes indicadas, etapas o componentes, pero no excluye la presencia de una o más partes adicionales, etapas o componentes. Una planta que comprende un determinado rasgo puede comprender así rasgos adicionales.

Se entiende que cuando se hace referencia a una palabra en singular (por ejemplo, planta o raíz), el plural también se incluye en el presente documento (por ejemplo, una pluralidad de plantas, una pluralidad de raíces). Por tanto, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "uno/a" no excluye la posibilidad de que haya más de uno de los elementos presentes, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "uno/una" normalmente significa "al menos uno/una".

Para los fines de la presente invención, la "identidad de secuencia" de dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos relacionadas, expresado como un porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias óptimamente alineadas que tienen restos idénticos (x100) dividido por el número de posiciones comparadas. Un hueco, es decir, una posición en una alineación donde un resto está presente en una secuencia pero no en la otra, se considera como una posición con restos no idénticos. La "alineación óptima" de dos secuencias se encuentra alineando las dos secuencias en toda la longitud de acuerdo con el algoritmo de alineación global de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J Mol Biol 48 (3): 443-53) en The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS, Rice y col., 2000, Trends in Genetics 16(6): 276-277; véase, por ejemplo, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) usando la configuración predeterminada (penalización por apertura de hueco = 10 (para nucleótidos)/10 (para proteínas) y penalización por extensión de hueco = 0,5 (para nucleótidos)/0,5 (para proteínas)). Para los nucleótidos, la matriz de puntuación predeterminada utilizada es EDNAFULL y para las proteínas, la matriz de puntuación predeterminada es EBLOSUM62.

"Sustancialmente idéntica" o "esencialmente similar", tal como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias, que, cuando se alinean de manera óptima como se ha definido anteriormente, comparten al menos un cierto porcentaje mínimo de identidad de secuencia (como se define más adelante).

Se pueden usar "condiciones de hibridación rigurosas" para identificar secuencias de nucleótidos, que son sustancialmente idénticas a una secuencia de nucleótidos dada. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 5 °C menos que el punto de fusión térmica (T_f) para las secuencias específicas a un pH y fuerza iónica definidos. La T_f es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de una secuencia objetivo complementaria hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Normalmente, se elegirán condiciones rigurosas en las que la concentración de sal es de aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y la temperatura es de al menos 60 °C. Disminuir la concentración de sal y/o aumentar la temperatura aumenta la rigurosidad. Las condiciones rigurosas para las hibridaciones de ARN-ADN (transferencias Northern usando una sonda de, por ejemplo, 100 nt) son, por ejemplo, aquellas que incluyen al menos un lavado en 0,2X SSC a 63 °C durante 20 minutos, o condiciones

equivalentes.

Se pueden proporcionar "condiciones de alta rigurosidad", por ejemplo, por hibridación a 65 °C en una solución acuosa que contiene 6x SSC (20x SSC contiene NaCl 3,0 M, Na-citrato 0,3 M, pH 7,0), 5x Denhardt's (100X Denhardt's contiene 2 % de Ficoll, 2 % de polivinilpirrolidona, 2 % de seroalbúmina bovina, 0,5 % de dodecilsulfato de sodio (SDS) y 20 µg/ml de ADN portador desnaturalizado (ADN de esperma de pescado monocatenario, con una longitud promedio de 120-3.000 nucleótidos) como competidor no específico. Después de la hibridación, el lavado de alta rigurosidad se puede realizar en varias etapas, con un lavado final (aproximadamente 30 minutos) a la temperatura de hibridación en 0,2-0,1X SSC, 0,1 % de SDS.

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

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

"Aumento del rendimiento cosechado" o "aumento del rendimiento de semillas o granos" se refiere a la mayor cantidad de semillas o granos cosechados de una pluralidad de plantas, comprendiendo cada uno alelos IND mutantes de acuerdo con la invención, en comparación con la cantidad de semilla o grano cosechada de un número similar de plantas isogénicas sin los alelos IND mutantes. El rendimiento generalmente se expresa en unidades de volumen de semilla cosechada por unidades de superficie, tales como fanegas/acre o kg/ha. El aumento de rendimiento generalmente se expresa en porcentaje, por lo que el rendimiento de la planta de referencia o control se denomina 100 % y el rendimiento de las plantas como se describe en el presente documento se expresa en % con respecto al rendimiento de la planta de control. Los aumentos de rendimiento observados en las plantas de *Brassica*, como se describe en el presente documento, variaron de al menos 101 % a al menos 124 % y se espera que sean factibles mayores aumentos de rendimiento. El aumento del rendimiento también puede variar del 104 % al 108 % o del 105 % al 110 %.

Descripción detallada

Como se describe en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), antes se descubrió que las plantas *Brassica napus*, que son homocigotas para un alelo *ind* defectivo completo en solo uno de sus dos genes *IND*, es decir en *IND-A1* o *IND-C1*, no mostró un aumento significativo en la resistencia al desgranado de vainas en comparación con las plantas de *Brassica napus* que no comprenden alelos *IND* mutantes, mientras que en plantas de *Brassica napus*, que eran homocigotas para un alelo *ind* efectivo completo en ambos genes *IND*, la resistencia al desgranado de las vainas aumentó significativamente, pero el nivel de resistencia al desgranado de la vaina era demasiado alto para mantener una capacidad de trillado agrónomicamente relevante. Por el contrario, la resistencia al desgranado de la vaina se incrementó significativamente en plantas de *Brassica napus* que comprenden tres alelos *ind* defectivos completos de los dos genes *IND* de *Brassica napus*, a un nivel por el cual las plantas mantienen una capacidad de trillado agrónomicamente relevante de las vainas.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que las plantas de *Brassica napus* con un fenotipo de desgranado de vaina similar a las plantas de *Brassica* descritas en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), es decir, que combinan una mayor resistencia al desgranado de vainas con una capacidad de trillado agrónomicamente relevante de las vainas, también puede obtenerse combinando dos alelos *IND* mutantes defectivos parciales con dos alelos *IND* mutantes defectivos completos en lugar de combinar tres alelos *IND* mutantes defectivos completos. Se descubrió además que las mutaciones en el gen *IND-C1* dieron como resultado un aumento más fuerte en la resistencia al desgranado de vainas que las mutaciones en el gen *IND-A1*. Un aumento más fuerte en la resistencia al desgranado de vainas en plantas de *Brassica napus* fue, por ejemplo, observado cuando los dos alelos *IND* mutantes defectivos completos eran alelos *IND* mutantes defectivos completos del gen *IND-C1* y los dos alelos *IND* mutantes defectivos parciales eran alelos *IND* mutantes defectivos parciales del gen *IND-A1* que cuando los dos alelos *IND* mutantes defectivos completos eran del gen *IND-A1* y los alelos *IND* mutantes defectivos parciales eran del gen *IND-C1*. Sorprendentemente, las plantas de *Brassica napus* que combinan una mayor resistencia al desgranado de la vaina con una capacidad de trillado agrónomicamente relevante de las vainas también se pueden obtener mediante la introducción de dos alelos *IND* mutantes defectivos parciales, en particular del gen *IND-C1*, solo.

Por tanto, en el presente documento se describe una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular una planta de *Brassica napus* que comprende un gen *IND-A1* y/o un gen *IND-C1*, caracterizada por que comprende dos alelos *IND* mutantes defectivos parciales en su genoma, en particular de un gen *IND-A1* y/o un gen *IND-C1*, preferentemente de un gen *IND-C1*, se describe en el presente documento, por lo que los alelos *ind* dan como resultado una cantidad significativamente reducida de proteína *IND* funcional del tipo codificado por el equivalente de tipo salvaje de estos alelos mutantes y, por lo tanto, una cantidad global reducida significativamente de las proteínas *IND* funcionales producidas en las células vegetales, específicamente en las vainas de semillas en desarrollo, *in vivo*.

La planta de *Brassica* puede además comprender dos alelos *IND* mutantes defectivos completos en su genoma, en particular de un gen *IND-C1* y/o un gen *IND-A1*, respectivamente, preferentemente de un gen *IND-C1*, tales como los descritos en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), por ejemplo, *ind-a1-ems01*, *ind-a1-ems05*, *ind-c1-ems01* o *ind-c1-ems03* y similares.

5 Se piensa que al combinar suficientes copias de alelos *IND* mutantes defectivos parciales específicos con copias suficientes de alelos *IND* mutantes defectivos completos y/o de tipo salvaje específicos en una planta, en particular una planta de *Brassica*, es posible ajustar la cantidad y/o el tipo de proteínas *IND* funcionales producidas, que a su vez influye en las propiedades de dehiscencia del fruto de la planta. Por lo tanto, la cantidad absoluta y relativa de las proteínas *IND* puede ajustarse de tal manera que proporcione plantas que produzcan suficientes proteínas *IND* para
10 permitir una capacidad de trillado agrónomicamente relevante de las vainas de las semillas mientras reduce el desgranado de las semillas antes o durante la cosecha.

También se describe en el presente documento una planta, en particular una planta de *Brassica*, que comprende al menos un alelo *IND* mutante defectivo parcial, que codifica una proteína *IND* parcialmente funcional, tal como las descritas más adelante, por ejemplo, *ind-a1-ems06*, *ind-a1-ems09*, *ind-a1-ems13*, *ind-c1-ems04*, *ind-c1-ems08* o *ind-c1-ems09*, y similares, mientras que los alelos restantes pueden ser defectivos parciales, alelos *IND* defectivos completos y/o de tipo salvaje.

En el presente documento se describe una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular una planta de *Brassica napus*, que comprende dos alelos *ind* defectivos parciales y alelos *ind* defectivos completos de los dos genes *IND* en esa planta de *Brassica*, en particular de los genes *Brassica napus* *IND-A1* y/o *IND-C1*, preferentemente el gen *IND-C1*, por lo que $n \leq 2$ (por ejemplo, $n = 0, 1$ o 2), de modo que al menos un alelo produce al menos una proteína *IND* funcional.

Se describe un único mutante *IND* homocigoto ($n = 2$, es decir, homocigoto para un alelo mutante defectivo parcial de un gen *IND*), y/o un mutante doble *IND* homocigoto- ($n = 4$, es decir, homocigoto para un alelo mutante defectivo completo y/o parcial de dos genes *IND*) de una planta de especie de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular de *Brassica napus*, de modo que los alelos mutantes son alelos mutantes de los dos genes *IND* en esa planta de *Brassica*, en particular de los genes *IND-A1* y/o *IND-C1*. Dichas plantas mutantes pueden usarse con fines de reproducción.

En el presente documento se describe una planta de *Brassica napus* con mutante *IND* defectivo parcial simple homocigota, en la que el genotipo de la planta se puede describir como *ind-a1^P/ind-a1^P*, *IND-C1/IND-C1*, o *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1^P/ind-c1^P*. En el presente documento se describe una planta de *Brassica napus* mutante parcial doble homocigota, en la que el genotipo de la planta se puede describir como *ind-a1^P/ind-a1^P*, *ind-c1^P/ind-c1^P*. En el presente documento se describe una planta de *Brassica napus* mutante *IND* doble parcial y completa homocigota, en la que el genotipo de la planta se puede describir como o *ind-a1^F/ind-a1^F*, *ind-c1^P/ind-c1^P* o *ind-a1^P/ind-a1^P*, *ind-c1^F/ind-c1^F*.

Además se proporcionan en el presente documento nuevas secuencias de ácido nucleico de genes/alelos mutantes *IND* defectivos parciales de especies de *Brassica*, así como las proteínas *IND* mutantes defectivas parciales. También se describen procedimientos de generación y combinación de alelos *IND* mutantes defectivos parciales en plantas de *Brassica*, así como plantas de *Brassica* y partes de plantas que comprenden combinaciones específicas de alelos *IND* mutantes defectivos completos y parciales en su genoma, de modo que se reduce el desgranado de semillas se reduce en estas plantas. El uso de estas plantas para transferir alelos *IND* mutantes defectivos parciales a otras plantas también se describe en el presente documento, como también los productos vegetales de cualquiera de las plantas descritas. Además, se proporcionan kits y procedimientos para la selección asistida por marcadores (MAS) para combinar o detectar genes y/o alelos *IND*. Cada una de las realizaciones de la invención se describe con detalle a continuación en el presente documento.

Las plantas de *Brassica* descritas en el presente documento que exhiben desgranado semillas reducido o retardado tienen un aumento en el rendimiento de la semilla cosechada. Sin embargo, se observó que no solo el rendimiento de semillas cosechado de las plantas de *Brassica* que comprende solo el alelo *ind-c1-09* en estado homocigoto (que muestra un fenotipo de desgranado de semilla reducido o retardado observable), sino que también se puede describir el rendimiento de semillas cosechado de otras plantas de *Brassica* que comprenden los dos alelos *IND* mutantes en estado homocigoto, es decir, en el que el genotipo de la planta puede describirse como *ind-a1^P/ind-a1^P*, *IND-C1/IND-C1*, o *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1^P/ind-c1^P* también aumentó significativamente, en comparación con las plantas de *Brassica* isogénicas que no comprenden los alelos *IND* mutantes, a pesar de la ausencia de un fenotipo de desgranado de semillas reducido o retrasado observable en las plantas de *Brassica* que comprende los alelos *IND* mutantes. También se describen plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en las que al menos dos alelos producen una proteína *IND* funcional, plantas que tienen un rendimiento de semillas más alto. Quedará claro que los dos alelos mutantes en el locus *IND-A* o en el locus *IND-C* pueden ser el mismo alelo mutante o un alelo mutante diferente.

Secuenciación de ácido nucleico de acuerdo con la invención

Se proporcionan secuencias de ácido nucleico *ind* mutante defectivo parcial que codifican proteínas *IND* parcialmente

funcionales, es decir, proteínas IND con una actividad biológica significativamente reducida (es decir, secuencias de ácido nucleico *IND* que comprenden una o más mutaciones, que dan como resultado una actividad biológica significativamente reducida de la proteína IND codificada) de genes *IND* de *Brassicaceae*, particularmente de especies de *Brassica*, especialmente de *Brassica napus*, pero también de otras especies de cultivos de *Brassica*. Por ejemplo, las especies de *Brassica* que comprenden un genoma A y/o C pueden comprender alelos de genes *IND-A1* o *IND-C1*, que son esencialmente similares a los alelos *IND* mutantes defectivos parciales de la presente invención y que pueden identificarse y combinarse en una sola planta. Además, se pueden usar procedimientos de mutagénesis para generar mutaciones en alelos *IND* de tipo salvaje, generando de ese modo alelos *ind* mutantes esencialmente similares a los alelos *IND* mutantes defectivos parciales de la presente invención para su uso de acuerdo con la invención. Debido a que los alelos *IND* específicos se combinan preferentemente en una planta mediante cruzamiento y selección, las secuencias de ácido nucleico *ind* pueden proporcionarse dentro de una planta (es decir, endógenamente), por ejemplo, una planta de *Brassica*, preferentemente una planta de *Brassica* que puede cruzarse con *Brassica napus* o que puede usarse para hacer una planta de "sintética" de *Brassica napus*. La hibridación entre diferentes especies de *Brassica* se describe en la técnica, por ejemplo, como se hace referencia en Snowdon (2007, Chromosome research 15: 85-95). La hibridación interespecífica puede, por ejemplo, usarse para transferir genes de, por ejemplo, el genoma C en *B. napus* (AACC) al genoma C en *B. carinata* (BBCC), o incluso desde, por ejemplo, el genoma C en *B. napus* (AACC) al genoma B en *B. juncea* (AABB) (por el evento esporádico de recombinación ilegítima entre sus genomas C y B). Las líneas de *Brassica napus* "resintetizadas" o "sintéticas" se pueden producir cruzando los antepasados originales, *B. oleracea* (CC) y *B. rapa* (AA). Las barreras de incompatibilidad entre especies y entre géneros pueden superarse con éxito en cruzamientos entre especies de cultivos de *Brassica* y sus parientes, por ejemplo, mediante técnicas de rescate de embriones o fusión de protoplastos (véase, por ejemplo, Snowdon, anteriormente).

Sin embargo, en el presente documento también se proporcionan secuencias de ácido nucleico *ind* aisladas (por ejemplo, aisladas de la planta por clonación o hechas sintéticamente por síntesis de ADN), así como sus variantes y fragmentos de cualquiera de estos, ya que estos pueden usarse para determinar qué secuencia está presente endógenamente en una planta o parte de la planta, si la secuencia codifica una proteína funcional, parcialmente funcional, no funcional o ninguna proteína (por ejemplo, mediante expresión en una célula huésped recombinante como se describe a continuación) y para la selección y transferencia de alelos específicos de una planta a otra, para generar una planta que tenga la combinación deseada de alelos *IND* mutantes defectivos parciales y/o completos.

Se han aislado nuevas secuencias de ácido nucleico *IND* mutantes defectivos parciales *IND-A1* e *IND-C1* de tipo salvaje de *Brassica napus*. Las secuencias *IND* de tipo salvaje como se describe en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052) se representan en las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 del listado de secuencias, mientras que las novedosas secuencias *ind* mutantes defectivos parciales de estas secuencias, y de secuencias esencialmente similares a estas, se describen en el presente documento a continuación y en los Ejemplos, con referencia a las secuencias *IND* de tipo salvaje. El ADN genómico que codifica la proteína IND de *Brassica napus* no comprende ningún intrón.

Las "secuencias de ácido nucleico *IND-A1*" o las "secuencias de ácido nucleico variante *IND-A1*" según la invención son secuencias de ácido nucleico que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o secuencias de ácido nucleico que tienen al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o la SEC ID NO:5. Estas secuencias de ácido nucleico también pueden denominarse como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias IND proporcionadas en el listado de secuencias.

Las "secuencias de ácido nucleico *IND-C1*" o las "secuencias de ácido nucleico variante *IND-C1*" según la invención son secuencias de ácido nucleico que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4 (*IND-C1-long*) o con la SEQ ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 al aminoácido en la posición 210 (*IND-C1-short*) o secuencias de ácido nucleico que tienen al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 (*IND-C1-long*), con la SEQ ID NO: 3 desde el nucleótido en la posición 46 hasta el nucleótido en la posición 633 (*IND-C1-short*) o con SEQ ID NO:7. Estas secuencias de ácido nucleico también pueden denominarse como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias IND proporcionadas en el listado de secuencias.

Por lo tanto, la invención proporciona nuevas secuencias de ácido nucleico mutante defectivo parcial de secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas *IND-A1* e *IND-C1* funcionales de tipo salvaje, incluyendo variantes y fragmentos de los mismos (como se define más adelante), por lo que la mutación en la secuencia de ácido nucleico resulta, preferentemente, en la inserción de uno o más aminoácidos, su delección o sustitución eliminado o sustituido en comparación con la proteína IND de tipo salvaje, en particular en la sustitución de uno o más aminoácidos y por lo cual la actividad biológica de la proteína IND se reduce significativamente. Una reducción significativa en la actividad biológica de la proteína IND se refiere en el presente documento a una reducción en la actividad de unión al ADN, la capacidad de dimerización y/o la actividad reguladora de la transcripción de la proteína IND, tal que la resistencia al desgranado de la vaina de una planta que expresa la proteína IND mutante aumenta en comparación con una planta que expresa la proteína IND de tipo salvaje correspondiente.

Para determinar la funcionalidad de un alelo/proteína *IND* específico en plantas, particularmente en plantas de *Brassica*, el nivel de resistencia al desgranado de las vainas en las plantas se puede determinar mediante la realización de ensayos macroscópicos, microscópicos e histológicos en frutos y flores de las plantas que comprenden el alelo/proteína *IND* específico y de plantas de tipo salvaje correspondientes análogas a los ensayos realizados en frutos y flores de *Arabidopsis* como se describe en Liljegren y col (2004, citado anteriormente) o como se describe en los Ejemplos siguientes. Brevemente, los cambios en la resistencia al desgranado de la vaina se pueden evaluar y/o medir, por ejemplo, por pruebas macroscópicas, tal como la inspección de las vainas de semillas a simple vista para evaluar, por ejemplo, la presencia o ausencia de los márgenes de la valva, la longitud del espolón de las vainas, etc.; una Prueba de Impacto Manual (MIT) para comparar el nivel de resistencia al desgranado de vainas entre diferentes líneas *IND* mutantes y las correspondientes líneas de tipo salvaje mediante la evaluación de la facilidad de apertura de las vainas al retorcer las vainas suavemente; una prueba de impacto aleatorio (RIT) para comparar la capacidad de trillado de las vainas de semillas de plantas de diferentes líneas *IND* mutantes y las correspondientes líneas de tipo salvaje, respectivamente, midiendo la semivida de la muestras de vainas de estas líneas; y/o mediante pruebas microscópicas para examinar, por ejemplo, si las células en el margen de la valva y la zona de dehiscencia de las vainas de semillas y cómo se ven afectadas por mutaciones en *IND*. Una vez que el compañero de dimerización de la proteína *IND* (por ejemplo, la propia proteína *IND* en caso de que su funcionamiento dependa de la formación de un homodímero u otra proteína en caso de que su funcionamiento dependa de la formación de un heterodímero) y/o el (los) gen (es) cuya transcripción está regulada por la proteína *IND* se identifica y caracteriza, la funcionalidad de un alelo/proteína *IND* específico puede evaluarse alternativamente mediante técnicas de ADN recombinante como se conoce en la técnica, por ejemplo, coexpresando ambos compañeros del dímero en una célula huésped (por ejemplo, una bacteria, tal como *E. coli*) y evaluando si todavía se pueden formar dímeros, si los dímeros aún pueden unirse al sitio de unión de bHLH de los genes regulados, y/o si la transcripción de estos genes todavía está regulada por esta unión.

Ambas secuencias de ácido nucleico endógenas y aisladas se proporcionan en el presente documento. También se proporcionan fragmentos de las secuencias *IND* mutantes y secuencias de ácido nucleico variante *IND* mutantes definidas anteriormente, para su uso como cebadores o sondas y como componentes de kits de acuerdo con otro aspecto de la invención (véase más adelante). Un "fragmento" de una secuencia de ácido nucleico *ind* o una variante de la misma (como se define) puede tener varias longitudes, tal como al menos 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 200, 500, 600 nucleótidos contiguos de la secuencia *IND* o *ind* (o de la secuencia variante).

30 *Secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas IND funcionales*

Las secuencias de ácido nucleico representadas en el listado de secuencias codifican proteínas *IND* funcionales de tipo salvaje de *Brassica napus*. Por tanto, estas secuencias son endógenas a las plantas de *Brassica napus* de las que se aislaron. Otras especies de cultivos de *Brassica*, variedades, líneas de reproducción o registros salvajes se pueden someter a detección selectiva para detectar otros alelos *IND*, que codifican las mismas proteínas *IND* o variantes de las mismas. Por ejemplo, las técnicas de hibridación de ácido nucleico (por ejemplo, análisis de transferencia Southern, usando, por ejemplo, condiciones de hibridación rigurosas) o técnicas basadas en PCR pueden usarse para identificar alelos *IND* endógenos a otras plantas de *Brassica*, tal como varias variedades de *Brassica napus*, líneas o registros, aunque también se pueden someter a detección selectiva plantas, órganos y tejidos de *Brassica juncea* (especialmente alelos *IND* en el genoma A), *Brassica carinata* (especialmente alelos *IND* en el genoma C) y *Brassica rapa* (genoma A) y *Brassica oleracea* (genoma C) para detectar otros alelos *IND* de tipo salvaje. Para cribar tales plantas, órganos o tejidos vegetales para la presencia de alelos *IND*, las secuencias de ácido nucleico *IND* proporcionadas en el listado de secuencias, o variantes o fragmentos de cualquiera de estos, se pueden usar. Por ejemplo, secuencias completas o fragmentos pueden usarse como sondas o cebadores. Por ejemplo, se pueden usar cebadores específicos o degenerados para amplificar secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas *IND* del ADN genómico de la planta, órgano o tejido vegetal. Estas secuencias de ácido nucleico *IND* pueden aislarse y secuenciarse usando técnicas estándar de biología molecular. El análisis bioinformático se puede utilizar para caracterizar el(los) alelos, por ejemplo, para determinar a qué alelo *IND* corresponde la secuencia y qué proteína *IND* o variante de proteína está codificada por la secuencia.

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

Además, se entiende que las secuencias de ácido nucleico *IND* y sus variantes (o fragmentos de cualquiera de estos) pueden identificarse *in silico*, seleccionando bases de datos de ácidos nucleicos para secuencias esencialmente similares. De manera análoga, una secuencia de ácido nucleico puede sintetizarse químicamente. También se proporcionan fragmentos de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, que se describen más adelante. Los fragmentos incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican solo el dominio bHLH, o fragmentos más pequeños que comprenden parte del dominio bHLH, tal como el dominio básico o el dominio HLH, etc.

60 *Secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas IND mutantes*

La invención proporciona secuencias de ácido nucleico que comprenden una o más deleciones, inserciones o sustituciones de nucleótidos relativas a las secuencias de ácido nucleico *IND* de tipo salvaje representadas en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7 del listado de la secuencia, en las que la(s) mutación(es) en la secuencia de ácido nucleico dan como resultado una actividad biológica significativamente reducida, es decir, un defectivo parcial de la actividad biológica, de la proteína *IND* codificada en relación con la proteína *IND* de tipo salvaje, así como fragmentos de tales moléculas de ácido nucleico mutantes. Dichas secuencias de ácido nucleico mutantes (denominadas secuencias *ind^P*) pueden generarse y/o identificarse utilizando diversos procedimientos conocidos, como se describe más adelante. De nuevo, tales moléculas de ácido nucleico se proporcionan tanto en forma endógena como en forma aislada.

Básicamente, cualquier mutación en las secuencias de ácido nucleico *IND* de tipo salvaje que da como resultado una proteína *IND* que comprende al menos una inserción de aminoácidos, La eliminación y/o sustitución, deleción y/o sustitución en relación con la proteína *IND* de tipo salvaje puede conducir a una actividad biológica significativamente reducida o nula. Sin embargo, se entiende que ciertas mutaciones en la proteína *IND* tienen más probabilidades de dar como resultado una abolición completa de la actividad biológica de la proteína *IND*, tales como mutaciones por las cuales porciones significativas de los dominios funcionales, tal como el dominio de unión al ADN ("b"), el dominio de dimerización ("HLH") y/o los dominios reguladores de la transcripción, faltan, o por el cual ciertos restos de aminoácidos cruciales dentro de estos dominios, tal como los aminoácidos Gln (Q), Ala (A) y Arg (R) en las posiciones 5, 9 y 13 o los restos de aminoácidos básicos (en particular los restos Arg (R)) en las posiciones 10 y 12 de la secuencia de dominio consenso bHLH definida por Heim y col., (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747; correspondientes a las posiciones 123, 127 y 131, y 128 y 130, respectivamente, en la SEQ ID NO: 10, véase la Tabla 1) faltan o están sustituidos, preferentemente por aminoácidos no similares o no conservadores, mientras que otras mutaciones en la proteína *IND* tienen más probabilidades de producir una reducción significativa de la actividad biológica de la proteína *IND*, tales como mutaciones que conducen a sustituciones de aminoácidos específicos, por ejemplo, los aminoácidos conservados indicados en la Tabla 1, causando una unión de ADN menos eficiente, una dimerización menos eficiente, y/o una regulación menos eficiente de la transcripción sin abolir completamente la actividad biológica de la proteína *IND* codificada. El documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052) describe, por ejemplo, alelos *IND* mutantes defectivos completos, en particular *ind-a1-ems01*, *ind-c1-EMS01* e *ind-c1-EMS03*, que comprenden una mutación sin sentido que da como resultado la producción de proteínas *IND* truncadas que carecen del dominio bHLH y alelos *IND* mutantes defectivos completos, en particular *ind-a1-ems05*, que codifica una proteína *IND* mutante en la que la Arg conservada en la posición 10 del dominio consenso bHLH se sustituye por una His aromática, mientras que la presente invención describe alelos *IND* mutantes defectivos parciales, en particular, por ejemplo, *ind-c1-ems09*, que codifica una proteína *IND* mutante en la que la Ala conservada en la posición 9 del dominio consenso bHLH se sustituye por una Thr e *indc1-ems04*, que codifica una proteína *IND* mutante en la que la Arg conservada en la posición 12 del dominio consenso bHLH se sustituye por una Cys.

Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender una o más mutaciones, tales como:

- una "mutación sin sentido", que es un cambio en la secuencia de ácido nucleico que resulta en la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido;
- una "mutación sin sentido" o "mutación del codón de TERMINACIÓN", que es un cambio en la secuencia de ácido nucleico que da como resultado la introducción de un codón de TERMINACIÓN prematuro y, por lo tanto, la terminación de la traducción (que da como resultado una proteína truncada); los genes vegetales contienen los codones de terminación de la traducción "TGA" (UGA en ARN), "TAA" (UAA en ARN) y "TAG" (UAG en ARN); así cualquier sustitución, inserción, deleción de nucleótidos que da como resultado que uno de estos codones esté en el ARNm maduro que se está traduciendo (en el marco de lectura) terminará la traducción;
- una "mutación de inserción" de uno o más aminoácidos, debido a que se han añadido uno o más codones en la secuencia de codificación del ácido nucleico;
- una "mutación por deleción" de uno o más aminoácidos, debido a que uno o más codones se han eliminado en la secuencia de codificación del ácido nucleico;
- una "mutación de desplazamiento de marco", que da como resultado que la secuencia de ácido nucleico se traduzca en un marco de lectura diferente corriente abajo de la mutación. Una mutación de cambio de marco puede tener varias causas, tales como la inserción, deleción o duplicación de uno o más nucleótidos.

La Tabla 1 indica la longitud de la proteína *IND* de *Arabidopsis* en SEQ ID NO:10, del ADN que codifica *IND* de *Arabidopsis* en la SEQ ID NO: 9 y de las proteínas *IND-A1* e *IND-C1* de *Brassica napus* en las SEQ ID NO: 2 y 6 y la SEQ ID NO: 4 y 8, respectivamente; la posición de los dominios bHLH en las proteínas *IND-A1* e *IND-C1* de *Brassica napus* en función de la posición indicada del dominio pfam PF00010, dominio smart SM00353, dominio prosite PS50888 y dominio superfam G3D.4.10.280.10 o SSF47459 de la proteína *IND* de *Arabidopsis* de acuerdo con la base de datos The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>; (<http://www.arabidopsis.org/>; locus At4 g00120.1; SEQ ID NO: 10); la posición de los dominios bHLH y los aminoácidos conservados en las proteínas *IND-A1* e *IND-C1* de *Brassica napus* en función de la posición indicada del dominio bHLH y los aminoácidos conservados en la proteína *IND* de *Arabidopsis* según Heim y col., (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747), de acuerdo con Toledo-Ortiz y col., (2003, Plant Cell 15: 1749-1770), y de acuerdo con Liljegren y col., (2004, Cell, 116, 843-853); como se describe adicionalmente en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052).

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

ES 2 761 583 T3

		AtIND1 (SEQ ID NO: 10)	AtIND1 (SEQ ID NO: 9)	BnIND-A1 (SEQ ID NO: 2/6)	BnIND-C1a/b (SEQ ID 4/8 de 16-210/SEQ ID 4/8)
<u>Región de codificación</u>	TAIR:	1-198 (198 AA)	1-594	1-185 (185 AA)	16-210/1-210 (195/210 AA)
	PF00010 SM00353 PS50888 G3D. 4,10,280,10 SSF47459 <u>Liljegren y col.</u>	121-168 124-173 112-168 114-196 114-198 30-198 (169 AA)	361-504 370-519 334-504 340-588 340-594 88-594	120-167 123-172 111-167 - -	133-180 136-185 124-180 127-208 127-210
<u>bHLH:</u>	<u>Heim y col., Toledo-Ortiz y col., Liljegren et al.</u>	119-174 115-167 119-167	355-523 343-501 355-501	118-173 114-166 118-166	131-186 127-179 131-179
<u>b</u>	<u>Heim y col., Toledo-Ortiz et al.</u>	119-131 115-131	355-393 343-393	118-132 114-132	131-145 127-145
	<u>Liljegren et al.</u>	119-131	355-393	118-132	131-145
<u>H1</u>	<u>Heim y col., Toledo-Ortiz y col., Liljegren et al.</u>	132-146 132-146 132-145	394-438 394-438 394-435	133-145 133-145 133-144	146-158 146-158 146-157
<u>L</u>	<u>Heim y col., Toledo-Ortiz y col., Liljegren et al.</u>	147-152 147-152 146-152	439-456 439-456 436-456	146-151 146-151 145-151	159-164 159-164 158-164
<u>H2</u>	<u>Heim y col., Toledo-Ortiz y col., Liljegren et al.</u>	153-174 153-167 153-167	457-523 457-501 457-501	152-173 152-166 152-166	165-186 165-179 165-179
<u>AA conservado</u>	N (1 ^T) V (2 ^T) Q (5 ^H) A (9 ^H - 13 ^T) R (10 ^H - 14 ^T) R (12 ^H - 16 ^T) R (13 ^H) I (16 ^H - 20 ^T) S (21 ^T) I (20 ^H - 24 ^T) L (23 ^H - 27 ^T) K (28 ^T) V (27 ^H) K (39 ^T) T (42 ^T) A (36 ^H) M (45 ^T) L (39 ^H -46 ^T) A (49 ^T) I (43 ^H - 50 ^T) Y (52 ^T) T (53 ^T) L (49 ^H -56 ^T) V (53 ^H) L (56 ^H)	115 116 123 127 128 130 131 134 135 138 141 142 145 150 153 154 156 157 160 161 163 164 167 171 174	343-345 346-348 367-379 379-381 382-384 388-390 391-393 400-403 404-406 412-414 421-423 424-426 433-435 448-450 460-463 460-462 466-468 469-471 478-480 481-483 487-489 490-492 499-501 511-513 580-582	114 115 122 126 127 129 130 133 134 137 140 141 144 149 152 153 155 156 159 160 162 163 166 170 173 (A)	127 128 135 139 140 142 143 146 147 150 153 154 157 162 165 166 168 169 172 173 175 176 179 183 186
<u>At ind</u>	<i>ind-5</i> (W13>TERMINACIÓN L <i>ind-2</i> (A26>FS) ^L <i>ind-6</i> ^W	42 55 Inserción después de 61	124-126 163-165 Inserción después de 185	25 - -	41 - -
		AtIND1 (SEQ ID NO: 10)	AtIND1 (SEQ ID NO: 9)	BnIND-A1 (SEQ ID NO: 2/6)	BnIND-C1a/b (SEQ ID 4/8 de 16-210/SEQ ID 4/8)

(continuación)

		AtIND1 (SEQ ID NO: 10)	AtIND1 (SEQ ID NO: 9)	BnIND-A1 (SEQ ID NO: 2/6)	BnIND-C1a/b (SEQ ID 4/8 de 16-210/SEQ ID 4/8)
	<i>ind-4</i> (Q63>TERMINACIÓN L	92	274-276	91	104
	<i>ind-3</i> (R99>H) L	128	382-384	127	140
	<i>ind-1</i> (L112>F) ^L	141	421-423	140	153
Heim y col., ^H : Heim y col., 2003, Mol Biol Evol 20, 735-747; Toledo-Ortiz y col., ^T : Toledo-Ortiz y col., 2003, Plant Cell 15: 1749-1770; Liljegren y col., ^L : Liljegren y col., 2004, Cell, 116, 843-853; ^W : Wu y col., 2006, Planta 224, 971-979.					

5 La alineación óptima de las secuencias de ácido nucleico IND de *Arabidopsis* (SEQ ID NO:9) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) con las secuencias e ácido nucleico *IND*, en particular las secuencias de ácido nucleico de *IND* de *Brassica* (SEQ ID NO:1 y 3) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 2 y 4) de la presente invención, permite determinar las posiciones de los dominios y aminoácidos conservados correspondientes en estas secuencias de *Brassica* (véase la Tabla 1 para las secuencias de *IND* de *Brassica* de la SEQ ID NO: 1 a 4).

10 Así, en una realización, se proporcionan secuencias de ácido nucleico de IND mutante defectivo parcial que comprenden uno o más de cualquiera de los tipos de mutaciones descritas anteriormente. Las secuencias *ind* defectivas parciales pueden comprender una o más mutaciones de codones de terminación (sin sentido), se proporcionan una o más mutaciones sin sentido y/o una o más mutaciones de desplazamiento de marco. Cualquiera de las secuencias de ácido nucleico mutantes anteriores se proporciona *per se* (en forma aislada), como las plantas y las partes de la planta que comprenden tales secuencias endógenamente. En las tablas a continuación en el presente documento se describen los alelos *ind* más preferidos y los depósitos de semillas de semillas de *Brassica napus* que comprenden uno o más alelos *ind* se han depositado como se indica.

15 Una mutación sin sentido en un alelo IND, tal como se usa en el presente documento, es una mutación en un alelo *IND* por el cual uno o más codones de terminación de la traducción se introducen en el ADN codificante y la secuencia de ARNm correspondiente del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente. Los codones de terminación de la traducción son TGA (UGA en el ARNm), TAA (UAA) y TAG (UAG). Por tanto, cualquier mutación (deleción, inserción o sustitución) que conduzca a la generación de un codón de terminación dentro del marco en la secuencia de codificación dará como resultado la terminación de la traducción y el truncamiento de la cadena de aminoácidos. Se describe un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido en la que se introduce un codón de terminación en el marco en la secuencia del codón de IND mediante una única sustitución de nucleótidos, tal como la mutación de CAG a TAG, TGG a TAG, TGG a TGA o CAA a TAA. Se describe un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido en la que se introduce un codón de terminación en el marco en la secuencia del codón IND mediante sustituciones dobles de nucleótidos, tal como la mutación de CAG a TAA, TGG a TAA, o CGG a TAG o TGA. Se describe un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido en la que se introduce un codón de terminación en el marco en la secuencia del codón IND mediante sustituciones triples de nucleótidos, tal como la mutación de CGG a TAA. La proteína truncada carece de los aminoácidos codificados por el ADN codificador corriente abajo de la mutación (es decir, la parte C-terminal de la proteína IND) y mantiene los aminoácidos codificados por el ADN codificador corriente arriba de la mutación (es decir, la parte N-terminal de la proteína IND). Se describe un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido presente en cualquier lugar frente al resto de Leu conservado del dominio H2 (en la posición 56 en la secuencia de dominio consenso bHLH como se describe por Heim y col., 2003, véase la Tabla 1), de modo que al menos falta el resto de Leu conservado. Cuanto más truncada esté la proteína IND mutante en comparación con la proteína IND de tipo salvaje, más puede el truncamiento dar como resultado una actividad reducida significativamente de la proteína IND mutante. Se cree que, con el fin de que la proteína IND mutante retenga algo de actividad biológica, al menos debería comprender el dominio de unión al ADN (b). Se describe un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido que da como resultado una proteína truncada de menos de aproximadamente 170 aminoácidos (que carece de la Leu conservada), menos de aproximadamente 150 aminoácidos (sin el dominio H2), menos de aproximadamente 145 aminoácidos (sin los dominios L y H2), o menos de aproximadamente 130 aminoácidos (sin el dominio HLH) (véase la Tabla 1).

Las siguientes tablas en el presente documento describen un rango de posibles mutaciones sin sentido en las secuencias *IND* de *Brassica napus* adecuadas para la invención:

Tabla 2a Posibles mutaciones del codón de TERMINACIÓN en *IND-A1* (SEQ ID NO:1)

Posición de aminoácidos	Posición de nucleótidos	Tipo salvaje → codón mutante	Tipo salvaje → aminoácido mutante
25	74	tgg → tag	TRP → TERMINACIÓN
	75	tgg → tga	TRP → TERMINACIÓN
	74+75	tgg → taa	TRP → TERMINACIÓN

(continuación)

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

Tabla 2b Posibles mutaciones del codón de TERMINACIÓN en *IND-C1* (SEQ ID NO: 3)

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

5 Obviamente, las mutaciones no se limitan a las que se muestran en las tablas anteriores y se entiende que las mutaciones de TERMINACIÓN análogas pueden estar presentes en alelos *ind* diferentes a los representados en el listado de secuencias y mencionados en las tablas anteriores.

10 Una mutación de sentido erróneo en un alelo *IND*, tal como se usa en el presente documento, es cualquier mutación (delección, inserción o sustitución) en un alelo *IND* por el cual uno o más codones se cambian en el ADN codificante y la secuencia de ARNm correspondiente del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente, que da como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos en la proteína *IND* de tipo salvaje por uno o más aminoácidos en la proteína *IND* mutante. En una realización, se proporciona un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido que da como resultado una sustitución de un resto de valina (Val) en la posición 124 de la proteína *IND* en

la SEQ ID NO: 2 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de metionina (Met), tal como el alelo *ind-a1-EMS06* (Tabla 3a). En otra realización, se proporciona un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido que da como resultado una sustitución de un resto de glicina (Gly) en la posición 146 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de serina (Ser), tal como el alelo *ind-a1-EMS09* (tabla 3a). En otra realización más, se proporciona un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido que da como resultado una sustitución de un resto de alanina (Ala) en la posición 159 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de valina (Val), tal como el alelo *ind-a1-EMS13* (Tabla 3a). En otra realización más, se proporciona un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido que da como resultado una sustitución de un resto de treonina (Thr) en la posición 136 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de metionina (Met), tal como el alelo *ind-c1-EMS08* (Tabla 3b). En una realización adicional, se proporciona un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido que da como resultado una sustitución de un resto de alanina (Ala) en la posición 139 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de treonina (Thr), tal como el alelo *ind-c1-EMS09* (Tabla 3b). En aún una realización adicional, se proporciona un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido que da como resultado una sustitución de un resto de arginina (Arg) en la posición 142 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de cisteína (Cys), tal como el alelo *ind-c1-EMS04* (Tabla 3b). Semilla de referencia que comprende los alelos *ind-a1-EMS06*, *ind-a1-EMS09*, *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS08*, *ind-c1-EMS09* e *ind-c1-EMS04* en estado homocigoto se han depositado en el NCIMB Limited (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Escocia, AB21 9YA, Reino Unido) el 7 de julio de 2008, con el número de acceso NCIMB 41570, NCIMB 41571, NCIMB 41572, NCIMB 41573, NCIMB 41574 y NCIMB 41575, respectivamente.

Tabla 3a: Mutaciones sin sentido en *IND-A1*

Posición de aminoácidos SEQ ID: 2/6	Posición de nucleótidos		Tipo salvaje → codón mutante	Tipo salvaje → aminoácido mutante	Nombre del alelo	Número de depósito
	SEQ ID: 1	SEQ ID: 5				
124	370	930	gtg → atg	VAL → MET	<i>ind-a1-EMS06</i>	NCIMB 41570
146	436	996	ggc → agc	GLY → SER	<i>ind-a1-EMS09</i>	NCIMB 41571
159*	476	1036	gcc → gtc	ALA → VAL	<i>ind-a1-EMS13</i>	NCIMB 41572

25

Tabla 3b: Mutaciones sin sentido en *IND-C1*

Posición de aminoácidos SEQ ID: 4/8	Posición de nucleótidos		Tipo salvaje → codón mutante	Tipo salvaje → aminoácido mutante	Nombre del alelo	Número de depósito
	SEQ ID: 3	SEQ ID: 7				
136	407	903	acc → atg	THR → MET	<i>ind-c1-EMS08</i>	NCIMB 41573
139*	415	911	gct → act	ALA → THR	<i>ind-c1-EMS09</i>	NCIMB 41574
142*	424	920	cgt → tgt	ARG → CYS	<i>ind-c1-EMS04</i>	NCIMB 41575

En otra realización, se proporciona un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido que codifica una proteína IND en la que uno o más de los aminoácidos conservados indicados anteriormente o en la Tabla 1 está/están sustituidos, tales como alelos *IND* mutantes defectivos parcial es *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS04* e *ind-c1-EMS09* (indicado con * en la Tabla 3). Como se describe en Heim y col., (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747), Toledo-Ortiz y col., (2003, Plant Cell 15: 1749-1770), Liljegren y col., (2004, Cell, 116, 843-853) y el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052), algunos de los aminoácidos conservados son más cruciales para la actividad biológica de la proteína IND que otros. Por tanto, por ejemplo, las mutaciones sin sentido que resultan en la sustitución de, por ejemplo, los aminoácidos en la posición 5, 9 (por ejemplo, *ind-c1-EMS09*) y 13 o en las posiciones 10 (por ejemplo, *ind-a1-EMS05*) y 12 (por ejemplo, *ind-c1-EMS04*) de la secuencia de dominio consenso bHLH definida por Heim y col., (citado anteriormente) tienen más probabilidades de dar como resultado una actividad significativamente reducida, debido a una capacidad reducida para unirse al ADN objetivo, de la proteína IND. Del mismo modo, las mutaciones sin sentido que resultan en la sustitución de, por ejemplo, los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 23, 27 en helix1 o en las posiciones 36, 39, 43, 49 (por ejemplo, *ind-a1-EMS13*), 53 y 56 en helix2 de la secuencia de dominio consenso bHLH definida por Heim y col., (citado anteriormente) es más probable que den como resultado una actividad significativamente reducida, debido a una capacidad de dimerización reducida, de la proteína IND.

40

Un alelo *IND* mutante defectivo parcial que comprende una mutación sin sentido que se puede usar es un alelo *IND* que comprende una mutación sin sentido correspondiente a la mutación sin sentido en los alelos *ind-1* defectivos parciales de *Arabidopsis* (Liljegen y col., 2004, citado anteriormente) (véase la Tabla 1).

5 Una mutación de desplazamiento de marco en un alelo *IND*, tal como se usa en el presente documento, es una mutación (delección, inserción, duplicación y similares) en un alelo *IND* que da como resultado la traducción de la secuencia de ácido nucleico en un marco diferente corriente abajo de la mutación.

Secuencias de aminoácido de acuerdo con la invención

10 Se proporcionan secuencias de aminoácidos *IND* mutantes defectivos parciales (es decir, secuencias de aminoácidos *IND* que comprenden una o más mutaciones, que dan como resultado una actividad biológica significativamente reducida de la proteína *IND*) de *Brassicaceae*, particularmente de especies de *Brassica*, especialmente de *Brassica napus*, pero también de otras especies de cultivos de *Brassica*. Por ejemplo, las especies de *Brassica* que comprenden un genoma A y/o C pueden codificar diferentes aminoácidos *IND*-A1 o *IND*-C1, que son esencialmente similares a las nuevas proteínas *IND* mutantes defectivas parciales de la presente invención. Además, se pueden usar procedimientos de mutagénesis para generar mutaciones en alelos *IND* de tipo salvaje, generando de este modo alelos mutantes que pueden codificar proteínas *IND* mutantes adicionales, que son esencialmente similares a las proteínas *IND* mutantes defectivas parciales de la presente invención. En una realización, las secuencias de aminoácidos *IND* mutantes se proporcionan dentro de una planta de *Brassica* (es decir, endógenamente). Sin embargo, en el presente documento se proporcionan secuencias de aminoácidos *IND* aisladas (por ejemplo, aisladas de la planta o hechas sintéticamente), así como sus variantes y fragmentos de cualquiera de estos.

20 Las secuencias de aminoácidos, que son esencialmente similares a las nuevas proteínas *IND* mutantes defectivas parciales de la presente invención pueden obtenerse reemplazando aminoácidos en las secuencias de aminoácidos *IND* defectivas parciales de la presente invención por otros aminoácidos que tienen propiedades similares (tales como hidrofobicidad similar, hidrofiliidad, antigenicidad, propensión a formar o romper estructuras α -helicoidales o estructuras de lámina β). Las tablas de sustitución conservadoras son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins*. W.H. Freeman and Company y la Tabla 4 de la presente solicitud de patente).

Tabla 4 Ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservadas

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

30 Se han aislado nuevas secuencias de aminoácidos *IND* mutantes defectivas parciales de proteínas *IND*-A1 e *IND*-C1 de tipo salvaje de *Brassica napus*. Las secuencias *IND* de tipo salvaje como se describe en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052) se representan en las SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO: 4, mientras que las nuevas secuencias *IND* mutantes defectivas parciales de estas secuencias, y de secuencias esencialmente similares a estas, se describen en el presente documento a continuación y en los Ejemplos, con referencia a las secuencias *IND* de tipo salvaje. Tal como se ha descrito anteriormente, las proteínas *IND* de tipo salvaje de *Brassica napus* tienen una longitud de aproximadamente 185-210 aminoácidos y comprenden una serie de dominios estructurales y funcionales.

35 Las "secuencias de aminoácidos *IND*-A1" o las "secuencias de aminoácidos variantes *IND*-A1" según la invención son secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de Identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2. También se puede hacer referencia a estas secuencias de aminoácidos como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias *IND* proporcionadas en el listado de secuencias.

40 Las "secuencias de aminoácidos *IND*-C1" o las "secuencias de aminoácidos variantes *IND*-C1" según la invención son secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4 (*IND*-C1-long) o con la SEQ ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 al aminoácido en la posición 210 (*IND*-C1-short). Estas secuencias de aminoácidos también pueden denominarse como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias *IND* proporcionadas en el listado de secuencias.

45 Por tanto, la invención proporciona nuevas secuencias mutantes defectivas parciales de secuencias de aminoácidos

de proteínas IND-A1 e IND-C1 funcionales de tipo salvaje, incluyendo variantes y fragmentos de las mismas (como se define más adelante), por lo que la mutación en la secuencia de aminoácidos preferentemente da como resultado una reducción significativa en la actividad biológica de la proteína IND en comparación con la actividad biológica de la proteína IND de tipo salvaje correspondiente. Una reducción significativa en la actividad biológica de la proteína IND se refiere en el presente documento a una reducción en la actividad de unión al ADN, la capacidad de dimerización y/o la actividad reguladora de la transcripción de la proteína IND, tal que la resistencia al desgranado de la vaina de una planta que expresa la proteína IND mutante se incrementa en comparación con una planta que expresa la proteína IND de tipo salvaje correspondiente en comparación con la resistencia al desgranado de la vaina de una planta de tipo salvaje correspondiente.

Ambas secuencias de aminoácidos endógenas y aisladas se proporcionan en el presente documento. También se proporcionan fragmentos de las secuencias de aminoácidos IND y las secuencias de aminoácidos variantes IND definidas anteriormente. Un "fragmento" de una secuencia de aminoácidos IND o una variante de la misma (como se define) puede tener varias longitudes, tal como de al menos 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 150, 175, 180 aminoácidos contiguos de la secuencia IND (o de la secuencia variante).

15 *Secuencias de aminoácidos de las proteínas IND funcionales*

Las secuencias de aminoácidos representadas en el listado de secuencias son proteínas IND funcionales de tipo salvaje de *Brassica napus*. Por tanto, estas secuencias son endógenas a las plantas de *Brassica napus* de las que se aislaron. Otras especies de cultivos de *Brassica*, variedades, líneas de reproducción o registros salvajes pueden seleccionarse para otras proteínas IND funcionales con las mismas secuencias de aminoácidos o variantes de las mismas, tal como se ha descrito anteriormente.

Además, se entiende que las secuencias de aminoácidos IND y sus variantes (o fragmentos de cualquiera de estos) pueden identificarse *in silico*, seleccionando bases de datos de aminoácidos para secuencias esencialmente similares. También se proporcionan fragmentos de moléculas de aminoácidos según la invención. Los fragmentos incluyen secuencias de aminoácidos del dominio bHLH, o fragmentos más pequeños que comprenden parte del dominio bHLH, tal como el dominio básico o el dominio HLH, etc.

Secuencias de aminoácidos de proteínas IND mutantes

La invención proporciona secuencias de ácido nucleico que comprenden una o más deleciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos relativas a las secuencias de aminoácidos IND de tipo salvaje representadas en las SEQ ID NO:2 y 4 del listado de secuencias, en las que la(s) mutación(es) en la secuencia de aminoácidos dan como resultado una actividad biológica significativamente reducida, es decir, un defectivo parcial de la actividad biológica, de la proteína IND codificada en relación con la proteína de tipo salvaje, así como fragmentos de tales moléculas de aminoácidos mutantes. Dichas secuencias de aminoácidos mutantes se pueden generar y/o identificar utilizando varios procedimientos conocidos, tal como se ha descrito anteriormente. De nuevo, tales moléculas de aminoácidos se proporcionan tanto en forma endógena como en forma aislada.

Tal como se ha descrito anteriormente, básicamente, cualquier mutación en las secuencias de aminoácidos IND de tipo salvaje que da como resultado una proteína IND que comprende al menos una inserción de aminoácidos, deleción y/o sustitución en relación con la proteína IND de tipo salvaje puede conducir a una actividad biológica significativamente reducida o nula. Sin embargo, se entiende que ciertas mutaciones en la proteína IND tienen más probabilidades de dar como resultado una abolición completa de la actividad biológica de la proteína IND, tales como mutaciones que conducen a proteínas truncadas, por el cual faltan porciones significativas de los dominios funcionales, tal como el dominio de unión al ADN ("b"), el dominio de dimerización ("HLH") y/o los aminoácidos que son importantes en la regulación de la transcripción (véase la Tabla 1), o mutaciones por las cuales ciertos restos de aminoácidos cruciales dentro de estos dominios, tal como los aminoácidos Gln (Q), Ala (A) y Arg (R) en las posiciones 5, 9 y 13 o los restos de aminoácidos básicos (en particular los restos Arg (R)) en las posiciones 10 y 12 de la secuencia de dominio consenso bHLH definida por Heim y col., (citado anteriormente; correspondientes a las posiciones 123, 127 y 131, y 128 y 130, respectivamente, en la SEQ ID NO: 10, véase la Tabla 1) faltan o están sustituidos, preferentemente por aminoácidos no similares o no conservadores, mientras que otras mutaciones de la proteína tienen más probabilidades de producir una reducción significativa de la actividad biológica de la proteína IND, tales como mutaciones que conducen a sustituciones de aminoácidos específicos, por ejemplo, los aminoácidos conservados indicados en la Tabla 1, causando una unión de ADN menos eficiente, una dimerización menos eficiente, y/o una regulación menos eficiente de la transcripción sin abolir completamente la actividad biológica de la proteína IND codificada.

Se describen proteínas IND mutantes defectivas parciales que comprenden una o más mutaciones de deleción o inserción, por lo que la (s) deleción(es) o inserción(es) dan como resultado una proteína mutante que tiene una actividad significativamente reducida *in vivo*. Dichas proteínas IND mutantes son proteínas IND en las que al menos 1, al menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 100, 150, 175, 180 o más aminoácidos se delecionan o insertan en comparación con la proteína IND de tipo salvaje, por lo que la (s) deleción(es) o inserción(es) dan como resultado una proteína mutante que tiene una actividad significativamente reducida *in vivo*.

Se describen proteínas IND mutantes defectivas parciales que se truncan por lo que el truncamiento da como resultado una proteína mutante que tiene una actividad significativamente *in vivo*. Dichas proteínas IND truncadas son proteínas IND que carecen de dominios funcionales en la parte C-terminal de la proteína IND de tipo salvaje correspondiente y que mantienen la parte N-terminal de la proteína IND de tipo salvaje correspondiente. Por tanto, se describe una proteína IND mutante defectiva parcial que comprende la parte N-terminal de la proteína IND de tipo salvaje correspondiente hasta el resto Leu conservado del dominio H2, pero sin incluirlo (en la posición 56 en la secuencia consenso del dominio bHLH como describen Heim y col., 2003, véase anteriormente). Cuando más truncada está la proteína mutante en comparación con la proteína de tipo salvaje, más puede el truncamiento dar como resultado una actividad reducida significativamente de la proteína IND mutante. Se cree que, con el fin de que la proteína IND mutante retenga algo de actividad biológica, al menos debería comprender el dominio de unión al ADN (b). Se describe una proteína IND mutante defectiva parcial que comprende la parte N-terminal de la proteína IND de tipo salvaje correspondiente que carece de parte o todo el segundo dominio H, y/o carece de parte o todo el dominio L, y/o carece de parte o todo del primer dominio H (véase la Tabla 1).

En otra realización más, se proporcionan proteínas IND mutantes defectivas parciales que comprenden una o más mutaciones de sustitución, por lo que la(s) sustitución(es) dan como resultado una proteína mutante que tiene una actividad significativamente reducida *in vivo*. En una realización, se proporciona una proteína IND mutante defectiva parcial que comprende una mutación por sustitución que da como resultado una sustitución de un resto de valina (Val) en la posición 124 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de metionina (Met), tal como la proteína IND mutante defectiva parcial codificada por el alelo *ind-a1-EMS06* (Tabla 3a). En otra realización, se proporciona una proteína IND mutante defectiva parcial que comprende una mutación por sustitución que da como resultado una sustitución de un resto de glicina (Gly) en la posición 146 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de serina (Ser), tal como la proteína IND mutante defectiva parcial codificada por el alelo *ind-a1-EMS09* (Tabla 3a). En otra realización más, se proporciona una proteína IND mutante defectiva parcial que comprende una mutación por sustitución que da como resultado una sustitución de un resto de alanina (Ala) en la posición 159 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de valina (Val), tal como la proteína IND mutante defectiva parcial codificada por el alelo *ind-a1-EMS13* (Tabla 3a). En otra realización más, se proporciona una proteína IND mutante defectiva parcial que comprende una mutación por sustitución que da como resultado una sustitución de un resto de treonina (Thr) en la posición 136 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de metionina (Met), tal como la proteína IND mutante defectiva parcial codificada por el alelo *ind-c1-EMS08* (Tabla 3b). En una realización adicional, se proporciona una proteína IND mutante defectiva parcial que comprende una mutación por sustitución que da como resultado una sustitución de un resto de alanina (Ala) en la posición 139 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de treonina (Thr), tal como la proteína IND mutante defectiva parcial codificada por el alelo *ind-c1-EMS09* (Tabla 3b). En aún una realización adicional, se proporciona una proteína IND mutante defectiva parcial que comprende una mutación por sustitución que da como resultado una sustitución de un resto de arginina (Arg) en la posición 142 de la proteína IND en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia esencialmente similar a la misma, en particular por un resto de cisteína (Cys), tal como la proteína IND mutante defectiva parcial codificada por el alelo *ind-c1-EMS04* (Tabla 3b).

En otra realización, se proporciona una proteína IND mutante defectiva parcial que comprende una mutación por sustitución que da como resultado la sustitución de restos de aminoácidos conservados como se ha indicado anteriormente o en la Tabla 1, tal como la proteína IND mutante defectiva parcial codificada por *ind-a1-EMS13*, *ind-c1-EMS04* o *ind-c1-EMS09* (indicado con * en la Tabla 3).

Procedimientos según la invención

Se describen procedimientos para generar y seleccionar plantas de semillas dehiscentes y células, partes, semillas y descendencia de las mismas, que contiene al menos un alelo parcial y/o al menos un alelo *ind* defectivo completo. En particular, se describen procedimientos para generar y seleccionar plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en particular plantas y células de *Brassica napus*, partes, semillas y descendencia de las mismas, que contiene al menos un alelo *ind* defectivo parcial y/o al menos completo al menos uno de los al menos dos loci *IND* diferentes en el genoma, por ejemplo al menos uno de los dos loci diferentes del gen *IND-A1* e *IND-C1* de *Brassica*, y para distinguir entre la presencia de alelos *ind* defectivos completos, alelos *ind* defectivos parciales y alelos *IND* de tipo salvaje en una planta de semilla dehiscente o parte de la planta. Por lo tanto, se describen procedimientos (tales como mutagénesis y/o selección asistida por marcadores) para generar y/o identificar alelos *ind* defectivos parciales y/o alelos *ind* defectivos completos o plantas de semillas dehiscentes o partes de plantas, que comprenden dichos alelos *ind* y para combinar un número adecuado de alelos *ind* defectivos parciales y/o alelos *ind* defectivos completos y/o diferentes tipos de alelos *ind* defectivos parciales y/o alelos *ind* defectivos completos en una sola planta de semillas dehiscentes para alterar las propiedades de dehiscencia del fruto de las plantas, en particular para reducir el desgranado de semillas o retrasar el desgranado de semillas hasta después de la cosecha, a la vez que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas.

Los alelos mutantes defectivos parciales y completos según la invención pueden generarse (por ejemplo inducidos por mutagénesis) y/o identificarse usando una variedad de procedimientos, que son convencionales en la técnica, por ejemplo, utilizando procedimientos basados en PCR para amplificar parte o la totalidad del ADN genómico o ADNc.

Después de la mutagénesis, las plantas se cultivan a partir de las semillas tratadas o se regeneran a partir de las células tratadas utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, las semillas mutagenizadas se pueden plantar de acuerdo con los procedimientos de cultivo convencionales y después de la autopolinización se forman semillas en las plantas. Como alternativa, las plántulas haploides duplicadas pueden extraerse de las células de microesporas o polen tratadas para formar inmediatamente plantas homocigotas, por ejemplo, como describen Coventry y col., (1988, Manual for Microspore Culture Technique for Brassica napus. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. de Guelph, Guelph, Ontario, Canadá). La semilla adicional que se forma como resultado de tal autopolinización en la generación actual o en una generación posterior puede cosecharse y seleccionarse para detectar la presencia de alelos *IND* mutantes, utilizando técnicas que son convencionales en la técnica, por ejemplo, técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (amplificación de los alelos *ind*) o técnicas basadas en hibridación, por ejemplo, análisis de transferencia Southern, cribado de la biblioteca BAC, y similares, y/o secuenciación directa de alelos *ind*. Para detectar la presencia de mutaciones puntuales (llamadas polimorfismos de nucleótido único o SNP) en alelos *IND* mutantes, se pueden usar procedimientos de detección de SNP convencionales en la técnica, por ejemplo, técnicas basadas en oligoglicación, técnicas basadas en extensión de base única o técnicas basadas en diferencias en sitios de restricción, tales como ARADO.

Tal como se ha descrito anteriormente, la mutagenización (espontánea e inducida) de un alelo *IND* de tipo salvaje específico da como resultado la presencia de uno o más nucleótidos delecionados, insertados o sustituidos (en adelante denominados "región de mutación") en el alelo *IND* mutante resultante. El alelo *IND* mutante se puede caracterizar así por la ubicación y la configuración de uno o más nucleótidos delecionados, insertados o sustituidos en el alelo *IND* de tipo salvaje. El sitio en el alelo *IND* de tipo salvaje donde se han insertado, delecionado o sustituido uno o más nucleótidos, respectivamente, en el presente documento también se denomina "región o secuencia de mutación". Una "región o secuencia flanqueante 5' o 3'" como se usa en el presente documento se refiere a una región o secuencia de ADN en el alelo *IND* mutante (o el tipo salvaje correspondiente) de al menos 20 pb, preferentemente al menos 50 pb, al menos 750 pb, al menos 1500 pb y hasta 5000 pb de ADN diferente del ADN que contiene el uno o más nucleótidos delecionados, insertados o sustituidos, preferentemente ADN del alelo *IND* mutante (o el tipo salvaje correspondiente) que se encuentra inmediatamente corriente arriba y contiguo con (región flanqueante o secuencia 5") o inmediatamente corriente abajo y contiguo con ("región o secuencia flanqueante en 3'") la región de mutación en el alelo *IND* mutante (o en el alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente). Una "región de unión" como se usa en el presente documento se refiere a una región de ADN en el alelo *IND* mutante (o el tipo salvaje correspondiente) donde la región de mutación y la región flanqueante 5' o 3' están unidas entre sí. Una "secuencia que abarca la región de unión entre la región de mutación y la región flanqueante 5' o 3'" comprende así una secuencia de mutación así como la secuencia flanqueante contigua a la misma.

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

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

Los cebadores tienen preferentemente una secuencia de entre 15 y 35 nucleótidos que en condiciones de PCR optimizadas "reconocen específicamente" una secuencia dentro de la región flanqueante 5' o 3', una secuencia dentro de la región de mutación, o una secuencia que abarca la región de unión entre las regiones flanqueantes y de mutación en 3' o 5' del alelo *IND* mutante específico, de manera que un fragmento específico ("fragmento específico de *IND* mutante" o amplicón discriminante) se amplifica a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende el alelo *IND* mutante específico. Esto significa que solo el alelo *IND* mutante dirigido, y ninguna otra secuencia en el genoma de la planta, se amplifica en condiciones de PCR optimizadas.

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

- oligonucleótidos que varían en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia flanqueante 5' o 3' de un alelo *IND* mutante específico o el complementario del

mismo (es decir, por ejemplo, la secuencia 5' o 3' que flanquea uno o más nucleótidos delecionados, insertados o sustituidos en los alelos *IND* mutantes de la invención, tal como la secuencia 5' o 3' que flanquea las mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento de marco descritas anteriormente o la secuencia 5' o 3' que flanquea las mutaciones del codón de TERMINACIÓN indicadas en las Tablas anteriores o las mutaciones de sustitución indicadas anteriormente o el complementario de las mismas) (cebadores que reconocen las secuencias flanqueantes 5'); o

- oligonucleótidos que varían en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos seleccionados de la secuencia de la región de mutación de un alelo *IND* mutante específico o el complementario del mismo (es decir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos insertada o sustituida en los genes *IND* de la invención o la complementaria de la misma (cebadores que reconocen secuencias de mutación).

Los cebadores pueden, por supuesto, ser más largos que los 17 nucleótidos consecutivos mencionados, y pueden, por ejemplo, tener 18, 19, 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt de longitud o incluso más. Los cebadores pueden consistir completamente en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias de nucleótidos mencionadas de secuencias de flanqueo y mutación. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de los cebadores en su extremo 5' (es decir, fuera de los 17 nucleótidos consecutivos ubicados en 3') es menos crucial. Por tanto, la secuencia 5' de los cebadores puede consistir en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias de flanqueo o mutación, según sea apropiado, pero puede contener varios (por ejemplo, 1,2, 5, 10) desapareamientos. La secuencia de 5' de los cebadores puede incluso consistir completamente en una secuencia de nucleótidos no relacionada con las secuencias de flanqueo o mutación, como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que representa sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. Dichas secuencias no relacionadas o secuencias de ADN flanqueantes con emparejamientos erróneos preferentemente no deberían ser superiores a 100, más preferentemente no más de 50 o incluso 25 nucleótidos.

Por otra parte, los cebadores adecuados pueden comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos que abarca la región de unión entre secuencias flanqueantes y de mutación (es decir, por ejemplo, la región de unión entre una secuencia 5' o 3' que flanquea uno o más nucleótidos delecionados, insertados o sustituidos en los alelos *IND* mutantes de la invención y la secuencia de uno o más nucleótidos insertados o sustituidos o la secuencia 3' o 5', respectivamente, flanqueando uno o más nucleótidos delecionados, tal como la región de unión entre una secuencia de 5' o 3' que flanquea mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento de marco en los genes *IND* de la invención descritos anteriormente y la secuencia de las mutaciones sin sentido, mutaciones sin sentido o de desplazamiento de marco o la región de unión entre una secuencia 5' o 3' que flanquea una posible mutación del codón de TERMINACIÓN como se indica en las Tablas anteriores o las mutaciones por sustitución indicadas anteriormente y la secuencia de la mutación potencial del codón de TERMINACIÓN o las mutaciones por sustitución, respectivamente), siempre que la secuencia de nucleótidos no se derive exclusivamente de la región de mutación o de las regiones flanqueantes.

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

Para los fines de la presente invención, el "complementario de una secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID No: X" es la secuencia de nucleótidos que puede derivarse de la secuencia de nucleótidos representada reemplazando los nucleótidos a través de su nucleótido complementario de acuerdo con las reglas de Chargaff (A↔T; G↔C) y leyendo la secuencia en la dirección 5' a 3', es decir, en dirección opuesta a la secuencia de nucleótidos representada.

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

Como se emplea en el presente documento, "la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. Z desde la posición X a la posición Y" indica la secuencia de nucleótidos que incluye ambos puntos finales de nucleótidos.

Preferentemente, el fragmento amplificado tiene una longitud de entre 50 y 1.000 nucleótidos, tal como una longitud entre 50 y 500 nucleótidos, o una longitud entre 100 y 350 nucleótidos. Los cebadores específicos pueden tener una secuencia que es entre 80 y 100 % idéntica a una secuencia dentro de la región flanqueante 5' o 3', a una secuencia dentro de la región de mutación, o a una secuencia que abarca la región de unión entre las regiones de flanqueo y mutación 3' o 5' del alelo *IND* mutante específico, siempre que los desapareamientos todavía permitan la identificación específica del alelo *IND* mutante específico con estos cebadores en condiciones de PCR optimizadas. Sin embargo, el rango de desapareamientos permitidos puede determinarse fácilmente de forma experimental y lo conoce un experto en la materia.

La detección y/o identificación de un "fragmento específico de *IND* mutante" puede producirse de varias maneras, por ejemplo, mediante la estimación del tamaño después de la electroforesis en gel o capilar o mediante procedimientos de detección basados en fluorescencia. Los fragmentos específicos de *IND* mutantes también pueden secuenciarse directamente. También se conocen en la técnica otros procedimientos específicos de secuencia para la detección de fragmentos de ADN amplificados.

Los protocolos de PCR estándar se describen en la técnica, tal como en el "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2ª edición, 1999) y otras referencias. Las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo la secuencia de los cebadores específicos, se especifica en un "protocolo de identificación por PCR" para cada alelo *IND* mutante específico. Sin embargo, se entiende que una serie de parámetros en el protocolo de identificación por PCR pueden necesitar ajustarse a condiciones específicas de laboratorio, y pueden modificarse ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un procedimiento diferente para la preparación de ADN puede requerir el ajuste de, por ejemplo, la cantidad de cebadores, polimerasa, concentración de $MgCl_2$ o las condiciones de hibridación usadas. De manera similar, la selección de otros cebadores puede dictar otras condiciones óptimas para el protocolo de identificación de PCR. Sin embargo, estos ajustes serán evidentes para una persona experta en la técnica, y además se detallan en los manuales de aplicación de PCR actuales, como el citado anteriormente.

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

Como alternativa, pueden usarse cebadores específicos para amplificar un fragmento específico de *IND* mutante que puede usarse como una "sonda específica" para identificar un alelo *IND* mutante específico en muestras biológicas. El contacto con el ácido nucleico de una muestra biológica, con la sonda, en condiciones que permiten la hibridación de la sonda con su fragmento correspondiente en el ácido nucleico, da como resultado la formación de un híbrido ácido nucleico/sonda. Se puede detectar la formación de este híbrido (por ejemplo, marcado del ácido nucleico o sonda), por lo que la formación de este híbrido indica la presencia del alelo *IND* mutante específico. Tales procedimientos de identificación basados en la hibridación con una sonda específica (ya sea en un vehículo en fase sólida o en solución) se han descrito en la técnica. La sonda específica es, preferentemente, una secuencia que, en condiciones optimizadas, hibrida específicamente a una región dentro de la región flanqueante 5' o 3' y/o dentro de la región de mutación del alelo *IND* mutante específico (en lo sucesivo, "región específica de *IND* mutante"). Preferentemente, la sonda específica comprende una secuencia de entre 10 y 1000 pb, 50 y 600 pb, entre 100 y 500 pb, entre 150 y 350 pb, que es al menos un 80 %, preferentemente entre un 80 y un 85 %, más preferentemente entre un 85 y un 90 %, especialmente preferentemente entre un 90 y un 95 %, lo más preferentemente entre un 95 % y 100% idéntico (o complementario) a la secuencia de nucleótidos de una región específica. Preferentemente, la sonda específica comprenderá una secuencia de aproximadamente 13 a aproximadamente 100 nucleótidos contiguos idénticos (o complementarios) a una región específica del alelo *IND* mutante específico.

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

- oligonucleótidos que varían en longitud desde 13 nt hasta aproximadamente 1000 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia flanqueante 5' o 3' de un alelo *IND* mutante específico o el complementario del mismo (es decir, por ejemplo, la secuencia 5' o 3' que flanquea uno o más nucleótidos delecionados, insertados o sustituidos en los alelos *IND* mutantes de la invención, tal como la secuencia 5' o 3' que flanquea las mutaciones sin sentido, mutaciones de sentido erróneo o de desplazamiento de marco descritas anteriormente o la secuencia 5' o 3' que flanquea las posibles mutaciones del codón de TERMINACIÓN indicadas en las Tablas anteriores o las mutaciones de sustitución indicadas anteriormente), o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia (sondas que reconocen secuencias flanqueantes en 5'); u
- oligonucleótidos que varían en longitud desde 13 nt hasta aproximadamente 1000 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación de un alelo *IND* mutante específico o el complementario del mismo (es decir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos insertada o sustituida en los genes *IND* de la invención, o la complementaria de la misma), o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con las mismas (sondas que reconocen secuencias de mutación).

Las sondas pueden consistir completamente en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias de nucleótidos mencionadas de secuencias de flanqueo y mutación. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de las sondas en sus extremos 5' o 3' es menos crucial. Por tanto, las secuencias 5' o 3' de las sondas pueden consistir en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias de flanqueo o mutación, según sea apropiado, pero pueden consistir en una secuencia de nucleótidos no relacionada con las secuencias de flanqueo o mutación. Dichas secuencias no relacionadas preferentemente no deberían tener una longitud mayor que 50, más preferentemente no mayor que 25 o incluso no mayor que 20 o 15 nucleótidos.

Por otra parte, las sondas adecuadas pueden comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos que abarca la región de unión entre las secuencias de flanqueo y de mutación (es decir, por ejemplo, la región de unión entre una secuencia 5' o 3' que flanquea uno o más nucleótidos delecionados, insertados o sustituidos en los alelos *IND* mutantes de la invención y la secuencia de uno o más nucleótidos insertados o sustituidos o la secuencia 3' o 5', respectivamente, flanqueando uno o más nucleótidos delecionados, tal como la región de unión entre una secuencia de 5' o 3' que flanquea mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento de marco en los genes *IND* de la invención descritos anteriormente y la secuencia de las mutaciones sin sentido, mutaciones erróneas o de desplazamiento de marco, o la región de unión entre una secuencia 5' o 3' que flanquea una posible mutación del codón de TERMINACIÓN como se indica en las Tablas anteriores o las mutaciones de sustitución indicadas anteriormente y la secuencia del potencial codón de TERMINACIÓN o mutación de sustitución, respectivamente),

siempre que la secuencia de nucleótidos mencionada no derive exclusivamente de la región de mutación o de las regiones flanqueantes.

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

- 5 La detección y/o identificación de una "región específica de *IND* mutante" que hibrida con una sonda específica puede ocurrir de varias maneras, por ejemplo, mediante la estimación del tamaño después de la electroforesis en gel o mediante procedimientos de detección basados en fluorescencia. También se conocen en la técnica otros procedimientos de secuencia específica para la detección de una "región específica de *IND* mutante" que hibrida con una sonda específica.
- 10 Como alternativa, las plantas o partes de plantas que comprenden uno o más alelos *ind* mutantes se pueden generar e identificar utilizando otros procedimientos, tales como el procedimiento "Delete-a-gene™", que utiliza PCR para detectar mutantes por delección generados por mutagénesis de neutrones rápidos (revisado por Li y Zhang, 2002, *Funct Integr Genomics* 2: 254-258), mediante el procedimiento TILLING (Guiado a lesiones locales inducidas EN Genomas, *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*) que identifica las mutaciones puntuales inducidas por EMS mediante cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (DHPLC) para detectar cambios de pares de bases mediante análisis heterodúplex (McCallum y col., 2000, *Nat Biotech* 18:455 y McCallum y col., 2000, *Plant Physiol.* 123, 439-442), etc. Como se ha mencionado, TILLING utiliza un cribado de alto rendimiento para las mutaciones (por ejemplo, utilizando la división Cel 1 de heterodúplex de ADN de tipo salvaje mutante y la detección utilizando un sistema de gel de secuenciación). Por tanto, el uso de TILLING para identificar plantas o partes de plantas que comprenden uno o más alelos *ind* mutantes y procedimientos para generar e identificar tales plantas, órganos de plantas, tejidos y semillas se abarcan en el presente documento. Por tanto, se describe un procedimiento que comprende las etapas de mutagenizar semillas de plantas (por ejemplo, mutagénesis EMS), agrupación de individuos de plantas o ADN, amplificación por PCR de una región de interés, formación de heterodúplex y detección de alto rendimiento, identificación de la planta mutante, secuenciación del producto de PCR mutante. Se entiende que otros procedimientos de mutagénesis y selección pueden usarse igualmente para generar tales plantas mutantes.
- 25

- En lugar de inducir mutaciones en alelos *IND*, los alelos mutantes naturales (espontáneos) pueden identificarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar ECOTILLING (Henikoff y col., 2004, *Plant Physiology* 135(2):630-6) para detectar una pluralidad de plantas o partes de plantas respecto a la presencia de alelos *ind* mutantes naturales. En cuanto a las técnicas de mutagénesis anteriores, preferentemente se seleccionan especies de *Brassica* que comprenden un genoma A y/o C, para que el alelo *ind* identificado pueda introducirse posteriormente en otras especies de *Brassica*, tal como *Brassica napus*, por cruzamiento (cruces inter o intraespecíficos) y selección. En ECOTILLING, los polimorfismos naturales en las líneas de reproducción o especies relacionadas se seleccionan mediante la metodología TILLING descrita anteriormente, en la que se usan individuos o grupos de plantas para la amplificación por PCR del objetivo *ind*, formación de heterodúplex y análisis de alto rendimiento. Esto puede ser seguido seleccionando plantas individuales que tengan una mutación requerida que pueda usarse posteriormente en un programa de reproducción para incorporar el alelo mutante deseado.
- 30
- 35

- Los alelos mutantes identificados se pueden secuenciar y la secuencia se puede comparar con el alelo de tipo salvaje para identificar la(s) mutación(es). Opcionalmente, la funcionalidad se puede probar como se ha indicado anteriormente. Usando este enfoque, se puede identificar una pluralidad de alelos *ind* mutantes (y plantas de *Brassica* que comprenden uno o más de estos). Los alelos mutantes deseados se pueden combinar con los alelos de tipo salvaje deseados mediante procedimientos de cruzamiento y selección como se describe más adelante. Finalmente, se genera una sola planta que comprende el número deseado de *ind* mutantes y el número deseado de alelos *IND* de tipo salvaje.
- 40

- Los oligonucleótidos adecuados como cebadores de PCR o sondas específicas para la detección de un alelo *IND* mutante específico también se pueden usar para desarrollar procedimientos para determinar el estado de cigosidad del alelo *IND* mutante específico.
- 45

Se puede desarrollar un ensayo basado en PCR para determinar la presencia de un alelo *IND* mutante y/o de tipo salvaje mutante específico correspondiente:

- Para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, dos cebadores que reconocen específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje pueden diseñarse de tal manera que estén dirigidos uno hacia el otro y tengan la región de mutación ubicada entre los cebadores. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente las secuencias flanqueantes de 5' y 3', respectivamente. Este conjunto de cebadores permite la amplificación de diagnóstico simultáneo por PCR del mutante, así como del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente.
- 50

- Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, dos cebadores que reconocen específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje pueden diseñarse de tal manera que estén dirigidos uno hacia el otro y que uno de ellos reconozca específicamente la región de mutación. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente la secuencia de la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje, respectivamente. Este conjunto de cebadores, junto con un tercer cebador que reconoce específicamente
- 55

la secuencia de la región de mutación en el alelo *IND* mutante, permiten la amplificación por PCR de diagnóstico simultáneo del gen *IND* mutante, así como del gen *IND* de tipo salvaje.

5 Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, dos cebadores que reconocen específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje pueden diseñarse de tal manera que estén dirigidos uno hacia el otro y que uno de ellos reconozca específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente la secuencia flanqueante 5' o 3' y la región de unión entre la región de mutación y la región flanqueante 3' o 5' del alelo *IND* de tipo salvaje, respectivamente. Este conjunto de cebadores, junto con un tercer cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región de mutación y la región flanqueante 3' o 5' del alelo *IND* mutante, respectivamente, permiten la amplificación por PCR de diagnóstico simultáneo del gen *IND* mutante, así como del gen *IND* de tipo salvaje.

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

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

20 La identificación de los productos de PCR específicos de tipo salvaje y mutante *IND* puede ocurrir por estimación del tamaño después de la electroforesis en gel o capilar (por ejemplo, para alelos *IND* mutantes que comprenden una cantidad de nucleótidos insertados o eliminados que da como resultado una diferencia de tamaño entre los fragmentos amplificados del tipo salvaje y el alelo *IND* mutante, tal que dichos fragmentos se puedan separar visiblemente en un gel); evaluando la presencia o ausencia de los dos fragmentos diferentes después de la electroforesis en gel o capilar, por lo que la amplificación de diagnóstico por PCR del alelo *IND* mutante puede, opcionalmente, realizarse por separado de la amplificación de diagnóstico por PCR del alelo *IND* de tipo salvaje; por secuenciación directa de los fragmentos amplificados; o por procedimientos de detección basados en fluorescencia.

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

30 Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, se puede desarrollar un ensayo basado en PCR para determinar la presencia de un alelo específico de *IND* de tipo salvaje mutante y/o correspondiente:

35 Para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, dos sondas específicas que reconocen el alelo *IND* de tipo salvaje pueden diseñarse de tal manera que una de ellas reconozca específicamente una secuencia dentro del alelo de tipo salvaje *IND* y que la región de mutación se localiza entre las secuencias reconocidas por las sondas. Estas sondas pueden ser sondas que reconocen específicamente las secuencias flanqueantes de 5' y 3', respectivamente. El uso de una o, preferentemente, El uso de uno o, ambas sondas, así como del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente.

40 Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, dos sondas específicas que reconocen el alelo *IND* de tipo salvaje pueden diseñarse de tal manera que una de ellas reconozca específicamente una secuencia dentro del alelo de tipo salvaje *IND* corriente arriba y corriente abajo de la región de mutación, preferentemente corriente arriba de la región de mutación, y que uno de ellos reconoce específicamente la región de mutación. Estas sondas pueden ser sondas que reconocen específicamente la secuencia de la región flanqueante 5' o 3', preferentemente la región flanqueante 5' y la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje, respectivamente. El uso de una o, preferentemente, ambas sondas, opcionalmente, junto con una tercera sonda que reconoce específicamente la secuencia de la región de mutación en el alelo *IND* mutante, permitir la hibridación diagnóstica del mutante y del gen *IND* de tipo salvaje.

45 Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, una sonda específica que reconoce el alelo *IND* de tipo salvaje puede diseñarse de tal manera que la sonda reconozca específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3', preferentemente la región flanqueante 5' y la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje. Esta sonda, opcionalmente, junto con una segunda sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3', preferentemente la región flanqueante 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, permite la hibridación diagnóstica del mutante y del gen *IND* de tipo salvaje.

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

55 Si la planta es homocigota para el gen *IND* mutante o el gen *IND* de tipo salvaje correspondiente, los ensayos de hibridación diagnósticos descritos anteriormente darán lugar a un único producto de hibridación específico, tal como uno o más fragmentos de ADN de hibridación (restricción), típico, preferentemente típico en longitud, ni para el mutante o el alelo *IND* de tipo salvaje. Si la planta es heterocigota para el alelo *IND* mutante, aparecerán dos productos de

hibridación específicos, lo que refleja tanto la hibridación del mutante como el alelo *IND* de tipo salvaje.

La identificación de los productos de PCR específicos de tipo salvaje y mutante *IND* puede ocurrir por estimación del tamaño después de la electroforesis en gel o capilar (por ejemplo, para alelos *IND* mutantes que comprenden una cantidad de nucleótidos insertados o eliminados que da como resultado una diferencia de tamaño entre los fragmentos de ADN hibridante (restricción) del tipo salvaje y el alelo *IND* mutante, tal que dichos fragmentos se puedan separar visiblemente en un gel); evaluando la presencia o ausencia de los dos productos de hibridación específicos diferentes después de la electroforesis en gel o capilar, por lo que la hibridación de diagnóstico del alelo *IND* mutante puede, opcionalmente, realizarse por separado de la hibridación de diagnóstico del alelo *IND* de tipo salvaje; por secuenciación directa de los fragmentos de hibridación de ADN (restricción); o por procedimientos de detección basados en fluorescencia.

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

Asimismo, los procedimientos de detección específicos para un alelo *IND* mutante específico que difieren de los procedimientos de amplificación basados en PCR o hibridación también se pueden desarrollar utilizando la información de secuencia específica del alelo *IND* mutante específico proporcionada en el presente documento. Dichos procedimientos de detección alternativos incluyen procedimientos de detección de amplificación de señal lineal basados en la escisión invasiva de estructuras particulares de ácido nucleico, también conocida como tecnología Invader™, (como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.985.557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", 6,001,567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage), procedimientos de detección basados en RT-PCR, tal como Taqman, u otros procedimientos de detección, tal como SNPlex, Extensión de base única (SBE), y similares. Brevemente, en la tecnología Invader™, la secuencia de mutación objetivo puede por ejemplo, hibridarse con un primer oligonucleótido de ácido nucleico marcado que comprende la secuencia de nucleótidos de la secuencia de mutación o una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante 5' y la región de mutación y con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia flanqueante 3' inmediatamente corriente abajo y adyacente a la secuencia de mutación, en la que el primer y segundo oligonucleótido se solapan por al menos un nucleótido. La estructura dúplex o triplex producida por esta hibridación permite la escisión selectiva de la sonda con una enzima (Cleavase®) que deja la secuencia objetivo intacta. La sonda marcada escindida se detecta posteriormente, potencialmente a través de una etapa intermedia que resulta en una mayor amplificación de señal.

Un "kit", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de reactivos con el fin de realizar el procedimiento de la invención, más particularmente, la identificación de un alelo *IND* mutante específico en muestras biológicas o la determinación del estado de cigosidad del material vegetal que comprende un alelo *IND* mutante específico. Más particularmente, una realización preferida del kit de la invención comprende al menos dos cebadores específicos, como se ha descrito anteriormente, para la identificación de un alelo *IND* mutante específico, o al menos dos o tres cebadores específicos para la determinación del estado de cigosidad. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo descrito en el presente documento en el protocolo de identificación de PCR. Como alternativa, de acuerdo con otra realización de la presente invención, el kit puede comprender al menos una sonda específica, que hibrida específicamente con ácido nucleico de muestras biológicas para identificar la presencia de un alelo *IND* mutante específico en el mismo, para la identificación de un alelo *IND* mutante específico, o al menos dos o tres sondas específicas para la determinación del estado de cigosidad. el kit puede comprender además cualquier otro reactivo (como, entre otros, tampón de hibridación, etiqueta) para la identificación de un alelo *IND* mutante específico en muestras biológicas, como se ha descrito anteriormente, para la identificación de un alelo *IND* mutante específico, o al menos dos o tres sondas específicas para la determinación del estado de cigosidad. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo (tal como, pero sin limitaciones, tampón, marcador de hibridación) para la identificación de un alelo *IND* mutante específico en muestras biológicas, usando la sonda específica.

Se puede usar el kit de la invención y sus componentes se pueden ajustar específicamente, para fines de control de calidad (por ejemplo, pureza de lotes de semillas), detección de la presencia o ausencia de un alelo *IND* mutante específico en material vegetal o material que comprende o deriva de material vegetal, tales como, entre otros, alimentos o productos alimenticios.

Con el término "cebador", como se usa en el presente documento, se quiere abarcar cualquier ácido nucleico que es capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un procedimiento dependiente de molde, tal como PCR. Por lo general, los cebadores son oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos, pero se pueden emplear secuencias más largas. Los cebadores se pueden proporcionar en forma bicatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria. Las sondas se pueden usar como cebadores, pero están diseñados para unirse al ADN o ARN objetivo y no tienen que usarse en un procedimiento de amplificación.

El término "reconocer" como se usa en el presente documento cuando se refiere a cebadores específicos, se refiere al hecho de que los cebadores específicos se hibridan específicamente con una secuencia de ácido nucleico en un alelo *IND* mutante específico en las condiciones establecidas en el procedimiento (como las condiciones del protocolo de identificación de PCR), por lo que la especificidad está determinada por la presencia de controles positivos y

negativos.

El término "hibridación", como se usa en el presente documento cuando se refiere a sondas específicas, se refiere al hecho de que la sonda se une a una región específica en la secuencia de ácido nucleico de un alelo *IND* mutante específico en condiciones de restricción estándar. Las condiciones de rigurosidad estándar tal como se usan en el presente documento se refieren a las condiciones de hibridación descritas en este documento o a las condiciones de hibridación convencionales descritas por Sambrook y col., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) que, por ejemplo, puede comprender las siguientes etapas: 1) inmovilizar fragmentos de ADN genómico de la planta o ADN de la biblioteca BAC en un filtro, 2) prehibridar el filtro durante 1 a 2 horas a 65 °C en 6 X SSC, 5 X reactivo de Denhardt, SDS al 0,5% y ADN portador desnaturizado de 20 µg/ml, 3) añadir la sonda de hibridación que se ha marcado, 4) incubar durante 16 a 24 horas, 5) lavar el filtro una vez durante 30 minutos a 68 °C en 6X SSC, SDS al 0,1 %, 6) lavar el filtro tres veces (dos veces durante 30 minutos en 30 ml y una vez durante 10 minutos en 500 ml) a 68 °C en 2 X SSC, SDS al 0,1 %, y 7) exponer el filtro durante 4 a 48 horas a una película de rayos X a -70 °C.

Como se usa en este documento, una "muestra biológica" es una muestra de una planta, material vegetal o producto que comprende material vegetal. Con el término "planta" se pretende abarcar tejidos vegetales, en cualquier etapa de madurez, así como cualquier célula, tejido u órgano tomados o derivados de tales plantas, incluidos, sin limitación, cualquier semilla, hoja, tallo, flor, raíz, célula individual, gameto, cultivos celulares, cultivo de tejidos o protoplasto. "Material vegetal", como se usa en el presente documento se refiere al material que se obtiene o deriva de una planta. Los productos que comprenden material vegetal se refieren a alimentos, piensos u otros productos que se producen utilizando material vegetal o que pueden estar contaminados por material vegetal. Se entiende que, en el contexto de la presente invención, tales muestras biológicas se analizan para determinar la presencia de ácidos nucleicos específicos para un alelo *IND* mutante específico, implicando la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. Por lo tanto, los procedimientos mencionados en el presente documento para identificar un alelo *IND* mutante específico en muestras biológicas, se refieren a la identificación en muestras biológicas de ácidos nucleicos que comprenden el alelo *IND* mutante específico.

También se describe en el presente documento la combinación de alelos *IND* específicos en una planta, la transferencia de uno o más alelos *IND* mutantes específicos de una planta a otra planta, comprendiendo las plantas uno o más alelos *IND* mutantes específicos, la progenie obtenida de estas plantas y para plantar células, partes de plantas y semillas de plantas derivadas de estas plantas.

Se describe un procedimiento para combinar un número adecuado de alelos *ind* defectivos parciales y/o alelos *ind* defectivos completos y/o diferentes tipos de alelos *ind* defectivos parciales y/o alelos *ind* defectivos completos en una única planta de semilla dehiscente para alterar las propiedades de dehiscencia del fruto de la planta, en particular para reducir el desgranado de semillas o retrasar el desgranado de semillas hasta después de la cosecha, a la vez que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agronómicamente relevante de las vainas.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para alterar las propiedades de dehiscencia del fruto, en particular para reducir el desgranado de semillas o retrasar el desgranado de semillas hasta después de la cosecha, a la vez que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trillado agronómicamente relevante de las vainas, de una planta de *Brassica* que comprenda al menos dos genes *IND*, que comprende las etapas de:

- generar y/o seleccionar una planta de *Brassica* que comprenda al menos dos genes *IND*, en el que al menos dos alelos de los al menos dos genes *IND* son alelos *ind* defectivos parciales, como se ha descrito anteriormente,
- seleccionar una planta con propiedades alteradas de dehiscencia del fruto, en particular, una planta en la que el desgranado de semillas se reduce o retrasa hasta después de la cosecha, mientras que las vainas mantienen al mismo tiempo una capacidad de trillado agronómicamente relevante

en el que dichos alelos *ind* defectivos parciales se generan por mutagénesis.

La planta *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND* puede ser una planta *Brassica napus* que comprende un gen *IND-A1* y un gen *IND-C1*. Los al menos dos alelos *ind* defectivos parciales pueden ser alelos defectivos parciales del gen *IND-C1*.

El procedimiento puede comprender además la etapa de generar y/o seleccionar una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en el que al menos dos alelos adicionales de los al menos dos genes *IND* son alelos *ind* defectivos completos, tal como se ha descrito anteriormente. La planta *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND* puede ser una planta *Brassica napus* que comprende un gen *IND-A1* y un gen *IND-C1*. Los al menos dos alelos *ind* defectivos parciales pueden ser alelos *ind* defectivos parciales del gen *IND-A1* y los al menos dos alelos *ind* defectivos completos son alelos *ind* defectivos completos del gen *IND-C1*.

También se describe un procedimiento para hacer una planta o semilla híbrida de cultivo de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular una planta o semilla híbrida de *Brassica napus*, en el que las propiedades de dehiscencia del fruto de la planta o de la planta cultivada a partir de la semilla se alteran, en particular, en el que el desgranado de semillas se reduce o se retrasa hasta después de la cosecha, mientras que las vainas mantienen al mismo tiempo una capacidad de trillado agronómicamente relevante, que comprende las etapas de:

- generar y/o identificar una primera planta que comprende un primer alelo *ind* defectivo parcial en estado homocigoto y una segunda planta que comprende un segundo alelo *ind* defectivo parcial en estado homocigoto, como se ha descrito anteriormente,
- cruzar la primera y la segunda planta y recolectar semillas híbridas F1 del cruce que comprenden dos alelos *ind* defectivos parciales de los al menos dos genes *IND*.

La primera planta puede comprender adicionalmente un primer alelo *ind* defectivo completo en estado homocigoto y la segunda planta puede comprender adicionalmente un segundo alelo *ind* defectivo completo en estado homocigoto, como se ha descrito anteriormente, y se recolectan semillas híbridas F1 que comprenden dos alelos *ind* defectivos parciales y dos alelos *ind* defectivo completos de los al menos dos genes *IND*.

La posibilidad de usar plantas progenitoras que comprenden un alelo parcial y/o completo inactivado en estado homocigoto para producir semillas híbridas a partir de las cuales se pueden cultivar plantas que muestren un desgranado de semillas reducido o retardado, a la vez que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trillado agrónomicamente relevante de las vainas, proporciona ventajas sobre el uso de una planta madre que comprende dos alelos *ind* defectivos completos eliminados en estado homocigoto y una planta madre que comprende un estado de alelo *ind* defectivo completo como se describe en el documento WO09/068313 (que reivindicando prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052), ya que ambas plantas madre producen vainas que muestran una capacidad de trillado agrónomicamente relevante, mientras que las vainas de la planta madre que comprende dos alelos *ind* defectivos completos en estado homocigoto producen vainas tubulares de las cuales es difícil cosechar las semillas.

El primer y el segundo alelos *ind* defectivos parciales pueden ser iguales, de modo que las semillas híbridas F1 son homocigotas para un alelo *ind* defectivo parcial. El primer y el segundo alelos *ind* defectivos completos pueden ser iguales, de modo que las semillas híbridas F1 son homocigotas para un alelo *ind* defectivo completo.

Los alelos *ind* defectivos completos (es decir, alelos *IND* cuya expresión funcional está completamente abolida), tales como los descritos en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), y/o alelos *ind* defectivos parciales (es decir, alelos *IND* cuya expresión funcional está parcialmente abolida) de acuerdo con la invención, se pueden combinar de acuerdo con las técnicas de cultivo estándar.

Los alelos *ind* defectivos parciales y/o completos pueden, por ejemplo, combinarse con una única planta de semillas dehiscentes mediante

(a) generar y/o identificar dos o más plantas, cada una de las cuales comprende uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o alelos *ind* defectivos totales, como se ha descrito anteriormente para el parcial y en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), para los alelos *ind* defectivos completos,

(b) cruzar una primera planta que comprende uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos seleccionados con una segunda planta que comprende uno o más otros alelos *ind* defectivos parciales y/o completos seleccionados, recolectando semillas F1 del cruzamiento y, opcionalmente, identificar una planta F1 que comprende uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos seleccionados de la primera planta con uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos seleccionados de la segunda planta, como se ha descrito anteriormente,

(c) opcionalmente, repetir la etapa (b) hasta obtener una planta F1 que comprende todos los alelos *ind* defectivos parciales y/o completos,

d) opcionalmente,

- identificar una planta F1, que es homocigota o heterocigota para un alelo *ind* defectivo parcial y/o completo seleccionado mediante la determinación del estado de cigosidad de los alelos *IND* mutantes, como se ha descrito anteriormente para el parcial y en el documento WO09/068313 (que reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 07023052), para los alelos *ind* defectivos completos, o

- generar plantas que son homocigotas para uno o más de los alelos *ind* de eliminación parcial y/o total seleccionados mediante una de las siguientes etapas:

- extracción de plantas haploides duplicadas de células de microesporas o polen tratadas de plantas F1 que comprenden uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos, como se ha descrito anteriormente,
- autofecundación de las plantas F1 que comprenden los uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos seleccionados para una o más generaciones (y), recolectar las semillas F1 Sy de las autofecundaciones e identificar las plantas F1 Sy, que son homocigotas para el uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos, tal como se ha descrito anteriormente.

Los alelos *ind* defectivos parciales y/o completos pueden, por ejemplo, ser transferidos de una planta de semillas dehiscentes a otra mediante

(a) generar y/o identificar una primera planta que comprende uno o más alelos *ind* defectivos parciales o completos seleccionados, como se ha descrito anteriormente (en el que la primera planta es homocigota o heterocigota para el uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos), como se ha descrito anteriormente (en el que la primera

planta es homocigota o heterocigota para el uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o totales),

(b) cruzar la primera planta que comprende el uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos con una segunda planta que no comprende el uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos, recolectar semillas F1 del cruzamiento (en el que las semillas son heterocigotas para un alelo *ind* defectivo parcial y/o completo si la primera planta era homocigota para ese alelo *ind* defectivo parcial y/o completo y en el que la mitad de las semillas son heterocigotas y la mitad de las semillas son azigas para, es decir, no comprenden, un alelo *ind* defectivo parcial y/o completo si la primera planta era heterocigota para ese alelo *ind* defectivo parcial y/o completo, y, opcionalmente, identificar las plantas F1 que comprenden uno o más alelos *ind* defectivos parciales o completos seleccionados, como se ha descrito anteriormente,

(c) retrocruzar las plantas F1 que comprenden uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos seleccionados con la segunda planta que no comprende uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos seleccionados para una o más generaciones (x), recolectar semillas de BCx de los cruces e identificar en cada generación las plantas de BCx que comprenden uno o más alelos *ind* defectivos parciales o completos seleccionados, como se ha descrito anteriormente,

d) opcionalmente, generar plantas Bcx que son homocigotas para uno o más de los alelos *ind* defectivos parciales y/o completos seleccionados mediante una de las siguientes etapas:

- extraer las plantas haploides duplicadas de células de microesporas o polen tratadas de plantas BCx que comprenden uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos, como se ha descrito anteriormente,
- autofecundar las plantas BCx que comprenden uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos para una o más generaciones (y), recolectar semillas de BCx Sy de las autofecundaciones e identificar plantas de BCx Sy, que son homocigotas para el uno o más alelos *ind* defectivos parciales y/o completos deseados, tal como se ha descrito anteriormente.

La primera y la segunda planta de semillas dehiscentes pueden ser plantas de *Brassicaceae*, particularmente plantas de *Brassica*, especialmente plantas de *Brassica napus* o plantas de otras especies de cultivos de *Brassica*. Como alternativa, la primera planta puede ser una planta *Brassicaceae*, particularmente una planta de *Brassica*, especialmente una planta de *Brassica napus* o una planta de otra especie de cultivo de *Brassica*, y la segunda planta puede ser una planta de una línea de reproducción de *Brassicaceae*, particularmente de una línea de cultivo de *Brassica*, especialmente de una línea de reproducción de *Brassica napus* o de una línea de reproducción de otra especie de cultivo de *Brassica*. "Línea de reproducción", tal como se usa en el presente documento, es una línea de planta, preferentemente homocigota, que se distingue de otras líneas de planta por un genotipo y/o fenotipo preferido que se usa para producir descendencia híbrida.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1: ADN codificante del gen *IND-A1* que codifica una proteína IND-A1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.

SEQ ID NO: 2: Proteína IND-A1 de tipo salvaje codificada por la SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO: 3: ADN codificante del gen *IND-C1* que codifica una proteína IND-C1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.

SEQ ID NO: 4: Proteína IND-C1 de tipo salvaje codificada por la SEQ ID NO:3.

SEQ ID NO: 5: ADN genómico del gen *IND-A1* que codifica una proteína IND-A1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.

SEQ ID NO: 6: Proteína IND-A1 de tipo salvaje codificada por la SEQ ID NO:5.

SEQ ID NO: 7: ADN genómico del gen *IND-C1* que codifica una proteína IND-C1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.

SEQ ID NO: 8: Proteína IND-C1 de tipo salvaje codificada por la SEQ ID NO:7.

SEQ ID NO: 9: ADN codificante del gen *IND1* de *Arabidopsis*.

SEQ ID NO: 10: Proteína IND1 de *Arabidopsis*.codificada por SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO: 11: Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS06 y -WT.

SEQ ID NO: 12: Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS06.

SEQ ID NO: 13: Oligonucleótido para la detección de IND-A1-WT.

SEQ ID NO: 14: Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS09 y -WT.

SEQ ID NO: 15: Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS09.

SEQ ID NO: 16: Oligonucleótido para la detección de IND-A1-WT.

SEQ ID NO: 17: Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS13 y -WT.

SEQ ID NO: 18: Oligonucleótido para la detección de IND-A1-EMS13.

SEQ ID NO: 19: Oligonucleótido para la detección de IND-A1-WT.

SEQ ID NO: 20: Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS04 y -WT.

SEQ ID NO: 21: Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS04.

SEQ ID NO: 22: Oligonucleótido para la detección de IND-C1-WT.

SEQ ID NO: 23: Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS08 y -WT.

SEQ ID NO: 24: Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS08.

SEQ ID NO: 25: Oligonucleótido para la detección de IND-C1-WT.

SEQ ID NO: 26: Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS09 y -WT.

SEQ ID NO: 27: Oligonucleótido para la detección de IND-C1-EMS09.

SEQ ID NO: 28: Oligonucleótido para la detección de IND-C1-WT.

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

Ejemplos

Ejemplo 1 - Generación y aislamiento de alelos *IND* mutantes defectivos parciales (*ind*)

Se generaron mutaciones en los genes *IND* representados en la SEQ ID NO: 1 o 3 y 5 o 7 del listado de secuencias y se identificaron del siguiente modo:

- 30.000 semillas de una línea de reproducción de colza de semillas oleaginosas de élite (semillas M0) se embebieron previamente durante dos horas en papel de filtro húmedo en agua desionizada o destilada. La mitad de las semillas fueron expuestas a 0,8 % de EMS y la mitad a 1 % de EMS (Sigma: M0880) y se incubaron durante 4 horas.
- Las semillas mutagenizadas (semillas M1) se enjuagaron 3 veces y se secaron en una campana de extracción durante la noche. Se cultivaron 30.000 plantas M1 en el suelo y se autofecundaron para generar semillas M2. Se cosecharon semillas M2 para cada planta M1 individual.
- Se cultivaron dos veces 4.800 plantas M2, derivadas de diferentes plantas M1, y se prepararon muestras de ADN a partir de muestras de hojas de cada planta M2 individual de acuerdo con el procedimiento CTAB (Doyle y Doyle, 1987, *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15).
- Se analizaron las muestras de ADN para detectar la presencia de mutaciones puntuales en los genes *IND* que causan la sustitución de aminoácidos en las proteínas *IND*, particularmente en el dominio bHLH de las proteínas *IND*, mediante secuenciación directa mediante técnicas de secuenciación estándar (Agowa) y análisis de las secuencias para detectar la presencia de mutaciones puntuales utilizando el software NovoSNP (VIB Antwerp).
- Se identificaron así los alelos *IND* mutantes defectivos parciales (*ind*) indicados en las Tablas 3a y b anteriores.

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

Ejemplo 2 - Identificación de una planta de *Brassica* que comprende un alelo mutante *IND* defectivo parcial de *Brassica*

Las plantas de *Brassica* que comprenden las mutaciones en los genes *IND* identificados en el Ejemplo 1 se identificaron como sigue:

- Para cada gen *IND* mutante identificado en la muestra de ADN de una planta M2, se cultivaron al menos 50 plantas M2 derivadas de la misma planta M1 que la planta M2 que comprende la mutación *IND* y se prepararon muestras de ADN a partir de muestras de hojas de cada planta M2 individual.
- Las muestras de ADN se seleccionaron para detectar la presencia de la mutación *IND* puntual identificada como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.
- Las plantas M2 heterocigotas y homocigotas (según se determinó según los electroferogramas) que comprendían la misma mutación se autofecundaron y se cosecharon las semillas M3.

Ejemplo 3 - Análisis de las propiedades de dehiscencia del fruto de plantas de *Brassica* que comprenden un gen *IND* de *Brassica* mutante defectivo parcial y/o completo

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

- Para examinar si los márgenes de la valva del fruto y las propiedades de dehiscencia de las vainas de semillas se vieron afectadas y cómo se vieron afectadas por la presencia de genes *IND* mutantes defectivos parciales y/o totales, el fruto *ind* se comparó con el fruto de tipo salvaje utilizando las siguientes pruebas macroscópicas:

- (a) Inspección de las vainas de semillas y plantas en general a simple vista para determinar las diferencias en el fenotipo de las vainas y plantas causadas por la presencia de diferentes genes *IND* mutantes defectivos parciales y/o completos. Determinación del fenotipo de las vainas: Cuando las vainas se cultivaron y se llenaron por completo, justo antes de amarillear, se evaluó el grado de nitidez de la zona que delinea la valva y el espolón en la zona donde ambas valvas ya no se tocan (en el extremo distal de la vaina) de 5 vainas aleatorias (de diferentes plantas si hay varias plantas por línea disponibles) y se atribuyó una puntuación de 1 a 5:1 para una indentación clara y una zona fina y afilada que separa la valva y el espolón; 2 para algo de indentación y zona transparente, aunque más borrosa, que separa la valva del espolón; 3 para valvas y espolón que todavía son bien observables como dos tejidos diferentes pero con una transición muy suave entre ellos; 4 para valvas y espolón que apenas son observables como tejidos diferentes; 5 para una transición completamente suavizada entre las valvas y el espolón sin ninguna diferenciación clara entre ambos tipos de tejidos, es decir, cuanto menor sea la indentación entre la valva y el espolón en el extremo distal de las vainas, mayor será la puntuación. Una puntuación de 1 (indentación aguda entre la valva y el pico) corresponde a un fenotipo de tipo salvaje de las vainas, más específicamente, un fenotipo de vaina sensible al desgranado de las vainas; una puntuación de 2 a 4 (transición más gradual entre la valva y el pico) corresponde a un fenotipo de vaina resistente al desgranado de las vainas, en la que el desgranado de las semillas se reduce o retrasa significativamente mientras se mantiene una capacidad de trillado agrónomicamente relevante de las vainas, de forma tal que las vainas todavía se pueden abrir a lo largo de la zona de dehiscencia aplicando fuerzas físicas limitadas; y una puntuación de 5 (sin indentación entre la valva y el espolón) corresponde a un fenotipo de vaina resistente al desgranado de las vainas, en el que el desgranado de las semillas se reduce o retrasa a un grado que ya no permite una capacidad de trillado agrónomicamente relevante de las vainas, de modo que las vainas no se puedan abrir a lo largo de la zona de dehiscencia aplicando fuerzas físicas limitadas.
- (b) Prueba de Impacto Manual (MIT) para determinar el aumento en la resistencia al desgranado de la vaina causada por la presencia de diferentes genes *IND* mutantes defectivos parciales y/o completos: El nivel de resistencia al desgranado de la vaina de las líneas de *Brassica napus* que comprenden un gen *IND* mutante defectivo parcial en estado homocigoto solo o un gen *IND* mutante defectivo parcial y completo en estado homocigoto y de las líneas *Brassica* que comprenden los alelos *IND* de tipo salvaje correspondientes se comparó en una forma semicuantitativa determinando las fuerzas físicas necesarias para abrir vainas maduras cerradas mediante la aplicación manual de torsión en las vainas. A la resistencia al desgranado de las vainas se le atribuyó una puntuación de 1 a 5 en función de esta fuerza física: 1 para vainas que se abren completamente a lo largo de la zona de dehiscencia con la menor torsión, 2-4 para las vainas que se abren solo en la base de la zona de dehiscencia y necesitan una torsión más fuerte para abrirse completamente y 5 para las vainas que solo se pueden aplastar y no se abren a lo largo de la zona de dehiscencia.
- (c) Prueba de Impacto Aleatorio (RIT) para determinar el aumento en la resistencia al desgranado de la vaina causada por la presencia de diferentes genes *IND* mutantes defectivos parciales y/o completos: El nivel de resistencia al desgranado de la vaina de las líneas de *Brassica napus* que comprenden un gen *IND* mutante defectivo parcial en estado homocigoto solo o un gen *IND* mutante defectivo parcial y completo en estado homocigoto y de las líneas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* de tipo salvaje correspondientes se comparó de manera cuantitativa determinando la semivida de las muestras de vainas de ambas líneas de acuerdo con Bruce y col., (2002, citado anteriormente). Más específicamente, dos muestras replicadas de 20 vainas maduras intactas de cada línea se sometieron a un RIT. Se colocaron 20 vainas junto con seis bolas de acero de 12,5 mm de diámetro en un recipiente cilíndrico de 20 cm de diámetro con su eje vertical. A continuación, el recipiente se sometió a un movimiento armónico simple de frecuencia 4,98 Hz y de carrera de 51 mm en el plano horizontal. Las vainas, en las que se comprobó la solidez antes de la prueba, se agitaron durante tiempos acumulativos de 10, 20, 40 y, si más del 50 % de las vainas permanecen intactas, 80 s. El tambor se abrió después de cada período y se contó el número de vainas cerradas. Las vainas se examinaron y clasificaron como "cerradas" si la zona de dehiscencia de ambas valvas todavía estaba cerrada. Por lo tanto, las vainas se clasificaron como "abiertas" si una o ambas valvas se habían separado, de modo que la semilla se había liberado. Si la mayoría de las vainas se rompió o dañó sin abrir la zona de dehiscencia, la muestra se marcó como "incontable" (indicado con * en la Tabla 5b). Para dar a cada punto un peso igual, los datos se separaron de forma uniforme en la variable independiente, el tiempo, añadiendo 1 y tomando el \log_{10} . El porcentaje de vainas abiertas p se transformó mediante la transformación logit, es decir, $\text{logit } p = \log_e(p/100-p)$. A continuación, se ajustó un modelo lineal a los datos transformados de tiempo y porcentaje, y se usó para estimar la semivida.
- (d) Pruebas de campo para determinar la relación entre la resistencia al desgranado de vainas, la capacidad de trillado y el rendimiento y la presencia de ciertos alelos *IND* mutantes en las plantas: El nivel de resistencia al desgranado de las vainas, la capacidad de trillado y el rendimiento de las líneas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* mutantes y las líneas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* de tipo salvaje correspondientes se compararon de forma semicuantitativa determinando y comparando el nivel de desgranado de semillas (SHAT), la capacidad de cosechadora combinada (CHA1) y la capacidad de trillado (CHA2) y de manera cuantitativa determinando y comparando el rendimiento de semillas por parcela después de combinar (YLDP) y el rendimiento de semillas después del trillado de la paja (YLDS) en el campo entre parcelas con plantas *ind* y parcelas con plantas de tipo salvaje. A las parcelas se les atribuyó una puntuación de 1-9 para indicar el nivel de destrucción de semillas en la parcela antes de la cosecha: una puntuación de 1 para indicar que prácticamente todas las plantas en la parcela se habían desgranado antes de la cosecha a una puntuación de 9 para indicar que prácticamente ninguna planta en la parcela se había desgranado antes de la cosecha. A

- 5 las parcelas se les atribuyó una puntuación de 1-5 para indicar el nivel de capacidad de cosecha de la cosechadora combinada en la parcela: una puntuación de 1, a 3 o 5 para indicar que fue difícil, factible o fácil, respectivamente, cosechar la parcela con una cosechadora combinada. A las parcelas se les atribuyó una puntuación de 1-5 para indicar el nivel de capacidad de trillado de la parcela: una puntuación de 1, a 3 o 5 para indicar que fue difícil, factible o fácil, respectivamente, para cosechar manualmente la semilla que queda en la paja después de la cosechadora combinada. El rendimiento de semilla por parcela después de combinar (YLDP; expresado en gramos por parcela) se determinó cosechando las semillas por parcela con una cosechadora combinada y pesando las semillas y el rendimiento de la semilla después de cortar la paja (YLDs; expresado en % en peso de la paja) se determinó cosechando manualmente las semillas restantes en la paja después de la cosecha de semillas con la cosechadora combinada.
- 10
- Para examinar más de cerca si las células en el margen valvar de las vainas de las semillas se ven afectadas por la presencia de genes *IND* mutantes defectivos parciales y/o completos, se compararon las secciones de fruto *ind* con secciones de fruto de tipo salvaje mediante evaluación microscópica de las vainas de las semillas:
- 15
- Explantes: Explantes de aproximadamente 3 mm tomados del centro y los extremos distales de las vainas de una etapa de desarrollo similar (aproximadamente 35 días después de la antesis (DAA), una etapa de desarrollo que corresponde estrechamente al inicio del amarilleamiento visible del pericarpio) y el tamaño se cosecharon de plantas cultivadas en un invernadero (tres vainas para cada genotipo). Una zona de dehiscencia se diseccionó de las vainas.
- 20
- Fijación: La fijación se realizó en tampón K-fosfato 100 mM a pH 7 con formalina al 10 % y glutaraldehído al 0,25 % durante un total de 4 horas. La infiltración al vacío se realizó después de 1 y 2 horas durante 15 minutos. El fijador se renovó después de cada infiltración al vacío.
 - Deshidratación: El espécimen se enjuagó 2 veces 30 minutos con tampón K-fosfato 100 mM a pH 7. La deshidratación se realizó con etanol técnico diluido con NaCl al 0,85 % en agua: 60 minutos (') en 50 % de etanol, 90' en 70 % de etanol, 90' en 80 % de etanol, 90' en 90 % de etanol, 90' en 95 % de etanol, 90' en 100 % de etanol a temperatura ambiente.
- 25
- Inclusión: La inclusión se realizó con los kits de inclusión Leica 7022-31731 Historesin o Kulzer Histo-Technik 7100 (Heraeus), que son kits de resina de tres componentes (una resina básica, un activador y un endurecedor). Los tres componentes se utilizaron en las proporciones recomendadas por el fabricante de la siguiente manera:
- 30
- la muestra se incubó durante 4 horas en 50 % de etanol/50 % de resina básica, durante la noche en 30 % de etanol/70 % de resina básica (opcional: a 4 °C), durante de 2 a 4 horas en 100 % de resina básica, durante un día en 100 % de resina básica después de renovar la resina básica y la infiltración al vacío durante 20' (opcionalmente a 4 °C), durante un día en resina básica + activador (1 %) ("medio de infiltración") después de la infiltración al vacío en este medio durante 20 minutos. La muestra se lavó con resina básica + activador (1 %)
- 35
- + endurecedor (1 ml en 15 ml) ("medio de inclusión"). La inclusión se realizó en moldes de inclusión planos (moldes de inclusión plana AGAR G3531 con cavidades de aproximadamente 300 µl: 14 mm de largo x 6 mm de ancho x 4 mm de profundidad): se añadieron 100-125 µl de medio/cavidad de inclusión, el medio de inclusión se polimerizó a 55 °C durante aproximadamente una hora, el tejido se colocó en el medio de inclusión polimerizado (1 explante/cavidad), las cavidades se llenaron con medio de inclusión, el medio de inclusión se polimerizó durante de 3 a 5 horas a 55 °C, los moldes se enfriaron, los bloques de plástico se retiraron de los moldes y se almacenaron a temperatura ambiente en un recipiente sellado (por ejemplo, tubo Eppendorf).
- 40
- Seccionamiento: Los bloques de plástico se pegaron con el lado plano en un bloque de perspex de 1 cm³ y se recortaron en cuadrados alrededor de la muestra. Se cortaron secciones de 4 µm (3 a 4 explantes por genotipo, aproximadamente 25 secciones por explante) con un cuchillo de vidrio ralph (hecho en la posición -1 del histoknifemaker de Reichert-Jung usando varillas de vidrio de 6 mm de espesor bajo un ángulo de corte de aproximadamente 6°) en el microtomo. Las secciones se unieron en portaobjetos de vidrio tratados con Vectabond (Laboratorios Vector).
- 45
- Demostración de lignina: se examinaron secciones no teñidas montadas en Eukitt usando un microscopio equipado para fluorescencia (con el filtro Zeiss set 02). La lignina presenta fluorescencia transparente azulada.
- 50
- Evaluación de histología: las secciones sin teñir se visualizaron usando DIC-Normaski o autofluorescencia (con el filtro Zeiss 18 - Excitación BP390-420; Emisión LP450).

Material vegetal:

- Progenie de una línea vegetal que comprende una mutación defectiva completa en el gen *IND-A1* (indicado como *ind-a1^F*), en particular el alelo *ind-a1-EMS01* descrito en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052) (indicado como *ind-a1-01* en la Tabla 5) y una mutación defectiva parcial en el gen *IND-C1* (indicado como *ind-c1^P*), en particular, los alelos *ind-c1-EMS04*, *-EMS08* y *-EMS09* indicados en la Tabla 3b (indicados como *ind-c1-04*, *-08* y *-09* en la Tabla 5), con genotipo *ind-a1^F/ind-a1^F*, */ind-c1^P/ind-c1^P* (es decir, plantas homocigotas de doble mutante), *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1^P/ind-c1^P* (es decir, plantas mutantes individuales homocigotas) e *ND-A1/IND-A1*, *IND-C1/IND-C1* (es decir, plantas de tipo salvaje).
- 55
- Progenie de una línea vegetal que comprende una mutación defectiva parcial en el gen *IND-A1* (indicado como *ind-a1^P*), en particular, los alelos *ind-a1-EMS06*, *-EMS09* y *-EMS13* alelos indicados en la Tabla 3a (indicados como *ind-a1-06*, *-09* y *-13* en la Tabla 5) y una mutación defectiva completa en el gen *IND-C1* (indicado como *ind-c1^F*), en particular el alelo *ind-c1-EMS01* y el alelo *ind-c1-EMS03* descritos en el documento WO09/068313 (que reivindica
- 60

prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052) (indicado como *ind-c1-01* y *-03* en la Tabla 5), con genotipo *ind-a1^P/ind-a1^P*, *ind-c1^F/ind-c1^F* (es decir, plantas homocigotas doble mutante), *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1^F/ind-c1^F* (es decir, plantas mutantes individuales homocigotas) e *IND-A1/IND-A1*, *IND-C1/IND-C1* (es decir, plantas de tipo salvaje).

5 Evaluación macroscópica:

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

- Las vainas de plantas hermanas *IND* homocigotas de doble mutante con genotipo *ind-a1^F/ind-a1^F*, *ind-c1^P/ind-c1^P* o *ind-a1^P/ind-a1^P*, *ind-c1^F/ind-c1^F* mostraron un fenotipo similar a las vainas de las plantas que comprenden un alelo *ind* defectivo completo en estado homocigoto y un alelo *ind* defectivo completo en estado heterocigoto descrito en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052) (genotipo: *ind-a1^F/ind-a1^F*, *IND-C1/ind-c1^F* o *IND-A1/ind-a1^F*, *ind-c1^F/ind-c1^F*, en el que *ind-a1^F* es un alelo *ind-a1* defectivo completo, en particular el alelo *ind-a1-EMS01* o *ind-a1-EMS05* descrito en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052) y en el que *ind-c1^F* es un alelo *ind-c1* defectivo completo, en particular el alelo *ind-c1-EMS01* o *ind-c1-EMS03* descrito en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052)). Más específicamente, los márgenes de las valvas de las vainas de estas plantas hermanas mutantes *IND* estaban en general mejor definidas que en las plantas hermanas *IND* mutantes dobles homocigotas descritas en el documento WO09/068313 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente europea EP 07023052) (que mostró una falta de definición de margen de la valva, particularmente evidente tanto en el extremo proximal como distal del fruto, en comparación con las vainas de plantas hermanas *IND* de tipo salvaje), pero la marcada indentación entre la valva y el espolón en el extremo distal de las vainas en las plantas hermanas de tipo salvaje todavía estaba ausente en gran medida en estas plantas mutantes como en las plantas hermanas *ind* defectivas completas doble homocigotas, que también mostraron una transición más gradual entre la valva y el tejido del espolón (véase también la puntuación visual en la Tabla 5a para plantas cultivadas en invernadero y en la Tabla 5b para plantas cultivadas en campo).
- Las vainas de plantas hermanas *IND* mutantes homocigotas simples (genotipo: *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1^P/ind-c1^P* o *ind-a1^P/ind-a1^P*, *IND-C1/IND-C1*) mostraron una morfología de vaina similar a las vainas de plantas hermanas *IND* de tipo salvaje, a excepción de las vainas de plantas hermanas *IND* mutantes simples homocigotas con genotipo *IND-A1-EMS01/IND-A1-EMS01*, *ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09*, que mostraron una morfología de la vaina alterada similar a las vainas de las plantas hermanas *IND* mutantes doble homocigotas con genotipo *ind-a1^F/ind-a1^F*, *ind-c1^P/ind-c1^P* o *ind-a1^P/ind-a1^P*, *ind-c1^F/ind-c1^F* (véase también la puntuación visual en la Tabla 5a para plantas cultivadas en invernadero y en la Tabla 5b para plantas cultivadas en campo). Se observó además que la presencia del alelo *ind-c1-EMS09* en estado heterocigoto en plantas (genotipo: *IND-A1/IND-A1*, *IND-C1/ind-c1-EMS09*) fue suficiente para causar una morfología de la vaina alterada similar a las vainas de las plantas hermanas *IND* mutantes dobles homocigotas con genotipo *ind-a1^F/ind-a1^F*, *ind-c1^P/ind-c1^P* o *ind-a1^P/ind-a1^P*, *ind-c1^F/ind-c1^F*. Se cree que el alelo *ind-c1-EMS09*, que comprende una mutación de sustitución en un aminoácido conservado del dominio de unión al ADN básico, podría producir una proteína *IND* negativa dominante que aún sea capaz de formar dímeros, pero no es capaz de unirse al sitio de unión de bHLH del gen o genes regulados.

b) Prueba de impacto aleatorio:

- La Tabla 5 muestra que el valor de LD50 fue, en general, más alto para las vainas de plantas que comprenden un alelo *ind-c1* defectivo completo en estado homocigoto y un alelo *ind-a1* defectivo parcial en estado homocigoto que para las vainas de plantas que comprenden un alelo *ind-a1* defectivo parcial en estado homocigoto que indica que las mutaciones en el alelo *IND-C 1* podría tener un efecto más fuerte sobre la resistencia al desgranado de las vainas que las mutaciones en el alelo *IND- A1*.

Tabla 5a

Genotipo	Puntuación visual de las vainas (0-10)	LD50 (sec)	Inferior corregido 95 %	Superior corregido 95 %
<i>IND-A1-06/IND-A1 -06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	8,06	3,1	1,78
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	9,05	2,83	2,15
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	7	26,31	4,83	7,64
<i>IND-A1-06/IND-A1 -06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8,86	*	*
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	5,74	4,2	2,06
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	7	29,38	3,8	5,18

45

(continuación)

Genotipo	Puntuación visual de las vainas (0-10)	LD50 (sec)	Inferior corregido 95 %	Superior corregido 95 %
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	9,36	2,6	1,7
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	9,05	2,83	2,15
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8	52,03	8,96	14,03
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8,44	2,74	2,26
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	9,05	2,83	2,15
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8,5	85,57	23,34	64,64
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	3	12,91	2,4	2,46
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	2	14,2	2,2	2,59
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	7	61,21	9,6	15,18
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8,86	*	*
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	7,74	3,98	1,54
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	9	56,68	8,9	13,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	0	7,89	2,88	2
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	0	10,91	2,5	2
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	9	37,8	5,77	8,4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	0	8,94	2,78	2,38
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	0	9,8	2,8	2,1
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8,5	31,81	6,66	10,45
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	0	7,22	3,56	1,82
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	8,5	46,6	7,82	11,48
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	9	90,11	*	*

Tabla 5b

Genotipo	Puntuación visual de las vainas (1-5)	Puntuación basada en la fuerza física necesaria para abrir vainas maduras cerradas (1-5)	LD50 (sec)	
			Campo 1	campo 2
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	9,7	7,2
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	6,2	8,3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	2	2	17,0	16,6
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	6,5	6,6
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	7,4	5,3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	2	15,3	12,4

(continuación)

Genotipo	Puntuación visual de las vainas (1-5)	Puntuación basada en la fuerza física necesaria para abrir vainas maduras cerradas (1-5)	LD50 (sec)	
			Campo 1	campo 2
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND- C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	7,5	6,9
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND- C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	5,4	7,2
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ ind-c1-01</i>	3	4	60,1	77,0
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND- C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	6,6	6,2
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND- C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	7,7	7,0
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ ind-c1-03</i>	3	4	49,8	63,0
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND- C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	11,7	10,7
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND- C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	10,7	7,9
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ ind-c1-01</i>	3	3	19,1	22,9
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND- C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	5,4	5,7
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND- C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	9,2	8,3
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ ind-c1-03</i>	3	3	10,2	38,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND- C1-04/IND-C1-04</i>	1	1	6,5	7,4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind- c1-04/ind-c1-04</i>	1	2	9,5	7,2
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ ind-c1-04</i>	3	5	87,7	126,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND- C1-08/IND-C1-08</i>	1	1	9,7	8,3
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind- c1-08/ind-c1-08</i>	1	1	4,9	9,0
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ ind-c1-08</i>	3	3	14,9	23,7
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND- C1-09/IND-C1-09</i>	1	1	9,1	8,3
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind- c1-09/ind-c1-09</i>	3	2	7,9	8,3
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ ind-c1-09</i>	5	5	*	*

*: inconstable

c) Pruebas de campo

La Tabla 5c muestra el nivel de desgranado de semillas (SHAT), la capacidad de cosechado de la cosechadora combinada (CHA1), la capacidad de trillado (CHA2), el rendimiento de semillas por parcela después de combinar (YLDP) y el rendimiento de semillas después del trillado de la paja (YLDS) determinado como se ha descrito anteriormente para parcelas de campo con plantas *ind* y plantas de tipo salvaje como se indica. El valor de YieldWTseg% representa el YLDP como un porcentaje del segregante de tipo salvaje dentro de una población segregante.

5

Tabla 5c

Genotipo	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (en gramos por parcela)	Rendimiento YLDS (en % en peso WTseg% de paja)	
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,3	5,0	5,0	2263,3	100	0,4
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND- C1-01/IND-C1-01</i>	8,4	4,6	5,0	2274,9	101	0,3

10

(continuación)

Genotipo	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (en gramos por parcela)	Rendimiento YLDS (en % en peso WTseg% de paja)	
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind- c1-01/ind-c1-01</i>	8,7	4,4	4,9	2525,1	112	1,1
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,6	4,6	4,9	2102,0	100	0,5
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,7	4,8	5,0	2292,7	109	0,4
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind- c1-03/ind-c1-03</i>	8,8	4,1	4,6	2276,2	108	1,3
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,3	5,0	4,9	1964,2	100	0,3
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,0	4,7	5,0	1872,0	95	0,4
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind- c1-01/ind-c1-01</i>	9,0	2,7	3,8	2323,3	118	5,7
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,6	4,8	5,0	2168,9	100	0,5
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,3	4,7	5,0	1985,6	92	0,4
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind- c1-03/ind-c1-03</i>	9,0	1,9	3,6	1726,7	80	13,6
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,3	4,8	5,0	1977,1	100	0,4
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,4	4,2	4,9	1929,3	98	0,5
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind- c1-01/ind-c1-01</i>	8,9	3,6	4,7	2445,6	124	2,0
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,3	4,2	5,0	1885,1	100	0,4
<i>ind-a1-13/ ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,3	4,8	5,0	2137,8	113	0,6
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind- c1-03/ind-c1-03</i>	8,9	2,8	3,9	2120,9	113	4,8
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	8,8	4,9	4,8	2120,4	100	0,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind- c1-04/ind-c1-04</i>	8,6	4,8	5,0	2136,4	101	0,6
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind- c1-04/ind-c1-04</i>	9,0	1,8	2,8	1437,0	68	19,1
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	8,0	4,8	5,0	2250,4	100	0,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind- c1-08/ind-c1-08</i>	8,3	4,3	4,9	2131,3	95	0,5
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind- c1-08/ind-c1-08</i>	8,9	3,0	4,1	2385,1	106	2,5
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	8,7	4,9	5,0	2080,0	100	0,4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind- c1-09/ind-c1-09</i>	8,7	4,6	4,6	2447,8	118	1,0
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind- c1-09/ind-c1-09</i>	9,0	1,1	1,8	589,6	28	28,4

Evaluación microscópica:

- 5 - Las vainas de plantas hermanas *IND* mutantes dobles homocigotas con genotipo *ind-a1^F/ind-a1^F, ind-c1^P/ind-c1^P* o *ind- a1^P/ind-a1^P, ind-c1^F/ind-c1^F* y las vainas de plantas hermanas *IND* mutantes simples homocigotas con genotipo *IND- A1-EMS01/IND-A1-EMS01, ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09*, cultivadas en condiciones de invernadero, mostraron en sus extremos distales lignificación en toda la zona de dehiscencia y una mala diferenciación de las células que pertenecen a la zona de dehiscencia de los tipos de células vecinas, tales como las células del tejido vascular y la capa de células lignificadas que normalmente se encuentran en la pared interna de la vaina (es decir, las células enb). En el centro de las vainas, la lignificación no se produjo en toda la zona de dehiscencia completa, pero las vainas mostraron solo unas pocas capas adicionales de células lignificadas, en cambio, donde la pared interna de la vaina está unida al tabique.
- 10

- Las vainas de plantas hermanas *IND* mutantes dobles homocigotas con genotipo *ind-a1-EMS01/ind-aA1-EMS01, ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09* mostraron tanto en sus extremos distales como en el centro de las vainas, lignificación en toda la zona de dehiscencia y una mala diferenciación de las células que pertenecen a la zona de dehiscencia de los tipos de células vecinas, tales como las células del tejido vascular y la capa de células lignificadas que normalmente se encuentran en la pared interna de la vaina (es decir, las células emb).

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

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

Cruce inicial: *ind/ind* (planta donante) X *IND/IND* (padre de élite)

Planta F1: *IND/ind*

Cruce BC1: *IND/ind* X *IND/IND* (padre recurrente)

Plantas BC1: 50 % de *IND/ind* y 50 % de *IND/IND*

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

Cruce BC2: *IND/ind* (planta BC1) X *IND/IND* (padre recurrente)

Plantas BC2: 50 % de *IND/ind* y 50 % de *IND/IND*

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

El retrocruzamiento se repite hasta las plantas BC3 a BC6 BC3-6: 50 % de *IND/ind* y 50 % de *IND/IND*

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

Cruce BC3-6 S1: *IND/ind* X *IND/ind*

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

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

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

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

- ADN molde:

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

En general, cada conjunto de cebadores consiste en un cebador específico tanto para el gen diana mutante como el gen de tipo salvaje (por ejemplo, cebador específico tanto para el alelo IND-A1-EMS06 como para el alelo IND-A1-WT) y un cebador específico para la diferencia de nucleótidos (por ejemplo, cebador específico para el alelo IND-A1-EMS06 o el alelo IND-A1-WT). Habitualmente, el último nucleótido del último cebador coincide con la diferencia de nucleótidos, pero se puede añadir uno (o más) nucleótidos específicos de objetivo adicionales para mejorar la hibridación entre el cebador y su secuencia objetivo.

- Mezcla de PCR: 2,5 µl de tampón de PCR x10 (MgCl₂ 15 mM), 0,25 µl de dNTP (20 mM), 1 µl de cebador directo

(10 µM), 1 µl de cebador inverso (10 µM), 0,25 µl de Taq-polimerasa (5U/µl), 19,5 µl de H₂O Milli-Q, 0,5 µl de ADN (20-50 ng/µl) = Volumen total de 25 µl.

- Perfil de termociclado: 4 min a 95 °C; 30x [1 min a 95 °C (desnaturalización) y 1 min a temperatura de hibridación y 2 min a 72 °C (alargamiento)]; 5 min a 72 °C; enfriar a 4 °C. La temperatura de hibridación óptima se puede determinar mediante PCR de gradiente de temperatura en la que la temperatura de hibridación se puede variar, por ejemplo, entre 57 °C y 70 °C en un termociclador MJ Research PTC-200 (Biozym). La temperatura de hibridación óptima para los cebadores específicos de *IND* de tipo salvaje es la temperatura a la que se puede detectar un fragmento de PCR transparente del tamaño esperado (como se describe a continuación) para la muestra de ADN de la planta *Brassica* de tipo salvaje y no para la muestra de ADN de la planta de *Brassica* mutante. La temperatura de hibridación óptima para los cebadores específicos de *IND* mutantes es la temperatura a la que se puede detectar un fragmento de PCR transparente del tamaño esperado (como se describe a continuación) para la muestra de ADN de la planta de *Brassica* mutante y no para la muestra de ADN de la planta de *Brassica* de tipo salvaje.
- Después de la amplificación, se añaden 5 µl de pigmento de carga (pigmento naranja) a 15 µl de las muestras de PCR y las muestras se cargan en un gel de agarosa al 1,5 %.
- Los patrones de bandas obtenidos después de la amplificación del ADN genómico de plantas mutantes de *Brassica* se evalúan de la siguiente manera:
 - No se deben aceptar datos de muestras de ADN aisladas del material foliar de las plantas de *Brassica* mutantes dentro de un solo ciclo de PCR y una única mezcla de PCR a menos que:
 - el control de ADN de tipo salvaje muestra el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT* y ningún fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX*
 - el control de ADN positivo muestra el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX* y ningún fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT*
 - Carriles que no muestran producto de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT* y el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX*, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó el ADN genómico molde, es un mutante homocigoto para *IND-Xx-EMSXX*.
 - Carriles que muestran el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT* y el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX*, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó el ADN genómico molde, es un mutante heterocigoto para *IND-Xx-EMSXX*.
 - Carriles que muestran el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT* y ningún producto de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX*, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó el ADN genómico molde, es una planta de tipo salvaje.

Como alternativa, se puede usar la tecnología Invader™ (Third Wave Agbio) para discriminar plantas que comprenden una mutación puntual específica en un alelo *IND* de plantas que no comprenden esa mutación puntual específica. Las siguientes sondas discriminantes Invader™ se desarrollaron para detectar la presencia o ausencia y el estado de cigosidad de los alelos mutantes identificados en el Ejemplo 4 (véase la Tabla 6):

- Las sondas específicas para el gen *IND* objetivo mutante o correspondiente de tipo salvaje (indicado como "5'flap1-x" y "5' flap2-x", respectivamente) y las sondas "invasoras" que pueden usarse en combinación con ellas están indicadas en la tabla 6. Generalmente, cada conjunto de sondas consiste en una sonda específica para el gen diana mutante o de tipo salvaje del cual el primer nucleótido después de la secuencia 5' flap coincide con la diferencia de nucleótidos (nucleótido subrayado en la Tabla 6) (la llamada "sonda primaria"; por ejemplo, la sonda con la SEQ ID NO: 12 es específica para *IND-A1-EMS06* y la sonda con la SEQ ID NO: 13 es específica para *IND-A1-WT*) y una sonda específica para los nucleótidos corriente arriba de la diferencia de nucleótidos (el llamado "invader® oligo"; por ejemplo, la sonda con la SEQ ID NO: 11 es específica para los nucleótidos corriente arriba de la diferencia de nucleótidos entre *IND-A1-EMS06* e *IND-A1-WT*). El último nucleótido del último cebador puede coincidir con la diferencia de nucleótidos en el mutante (como indican los nucleótidos en negrita en la Tabla 6), pero también se pueden usar otros nucleótidos para este último nucleótido siempre que la sonda primaria y el invasor® oligo aún pueden formar una sola superposición de bases cuando se hibridan con el ADN objetivo para generar la estructura invasiva específica reconocida por las enzimas Cleavase® (Third Wave Agbio).
- El procedimiento de ensayo Invader™ y la interpretación de los datos se realizan según lo prescrito por el fabricante (Third Wave Agbio). Brevemente, las secuencias de nucleótidos indicadas como "flap 1" y "flap2" en la Tabla 6 representan las secuencias de los "flap" 5' que se cortan de las sondas primarias en la fase primaria del ensayo Invader™ y que son complementarias a las secuencias en el casete FRET™ 1 y 2, respectivamente, y no complementarias a las secuencias mutantes diana o de tipo salvaje. Si las sondas primarias se cortan en la fase primaria y la sonda flap1 y/o la sonda flap2 se hibridan con los casetes FRET™ 1 y 2, respectivamente, en la fase secundaria, se genera una señal indicativa de la presencia en la muestra del gen *IND* objetivo mutante o correspondiente de tipo salvaje, respectivamente.

Tabla 6

n.º de alelo	Sondas	
IND-A1-EMS06	5' CGTAAGGGTAAGCGACGACCCTCAGACGT 3'	(SEQ ID NO: 11)
	5' flap1-ATGGTGGCTCGTCG 3'	(SEQ ID NO: 12)
IND-A1-WT	5' CGTAAGGGTAAGCGACGACCCTCAGACGT 3'	(SEQ ID NO: 11)
	5' flap2-GTGGTGGCTCGTC 3'	(SEQ ID NO: 13)
IND-A1-EMS09	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(SEQ ID NO: 14)
	5' flap1-ITGGCACCATCCTCT 3'	(SEQ ID NO: 15)
IND-A1-WT	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(SEQ ID NO: 14)
	5' flap2-CTGGCACCATCCTCT 3'	(SEQ ID NO: 16)
IND-A1-EMS13	5' CCTGCCGTTTCAAGAACTTGGTGTAGCGGATGT 3'	(SEQ ID NO: 17)
	5' flap1-ACTTCGTCGAGCATG 3'	(SEQ ID NO: 18)
IND-A1-WT	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(SEQ ID NO: 17)
	5' flap2-GCTTCGTCGAGCATG 3'	(SEQ ID NO: 19)
IND-C 1-EMS04	5' CATCCTCTTCAATATCCGGATCTTCTCGCTTATCC TTTCTCTACT 3'	(SEQ ID NO: 20)
	5' flap1-ACCGACGAGCCAC 3'	(SEQ ID NO: 21)
IND-C 1-WT	5' CATCCTCTTCAATATCCGGATCTTCTCGCTTATCC TTTCTCTACT 3'	(SEQ ID NO: 20)
	5' flap2-GCCGACGAGCCAC 3'	(SEQ ID NO: 22)
IND-C1-EMS08	5' CGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCCAGA 3'	(SEQ ID NO: 23)
	5' flap1-IGGTGGTGGCTCG 3'	(SEQ ID NO: 24)
IND-C1-WT	5' CGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCCAGA 3'	(SEQ ID NO: 23)
	5' flap2-CGGTGGTGGCTCG 3'	(SEQ ID NO: 25)
IND-C1-EMS09	5' CGAGGACCCCCAGACGGTGGTGT 3'	(SEQ ID NO: 26)
	5' flap1-ACTCGTCGGCGTAG 3'	(SEQ ID NO: 27)
IND-C1-WT	5' CGAGGACCCCCAGACGGTGGTGT 3'	(SEQ ID NO: 26)
	5' flap2-GCTCGTCGGCGT 3'	(SEQ ID NO: 28)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer CropScience AG

<120> Planta Brassica que comprende un alelo indehisciente mutante

<130> BCS 08-2010

5 <160> 28

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 558

<212> ADN

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

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(555)

<400> 1

ES 2 761 583 T3

atg tct ggc tca aaa gca gat gca gcc ata gcc cca ata gtc atg atg 48
 Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met
 1 5 10 15

gag cat cat cat ctc ctt atg aat tgg aac aaa cct att gat ctc att 96
 Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile
 20 25 30

aca gaa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat ttc ata gta gat cca 144
 Thr Glu Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Ile Val Asp Pro
 35 40 45

cct tcc gaa acc cta agc cac ttc cag ccc ccg ccg aca atc ttc tcc 192
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Ile Phe Ser
 50 55 60

gat cac gga gga gga gag gaa gca gaa gaa gaa gaa gaa gaa gaa gga 240
 Asp His Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly
 65 70 75 80

gag gaa gag atg gat ccg atg aag aag atg caa tac gcg att gct gcc 288
 Glu Glu Glu Met Asp Pro Met Lys Lys Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala
 85 90 95

atg cag ccc gta gac ctc gat cca gcc acc gtt cct aag ccg aac cgc 336
 Met Gln Pro Val Asp Leu Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg
 100 105 110

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

cgt aga gaa agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg gtg 432
 Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val
 130 135 140

cca ggc ggt gca aag atg gac act gcc tcc atg ctc gac gaa gcc atc 480
 Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile
 145 150 155 160

cgc tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg cta gct tct tca gcc 528
 Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Ala Ser Ser Ala
 165 170 175

tca cac tca gct tgg agc tcc tat gtc tga 558
 Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val
 180 185

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

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

<400> 2

ES 2 761 583 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val
 180 185

<210> 3

<211> 633

<212> ADN

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

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(630)

<400> 3

ES 2 761 583 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

gat acc taa 633
Asp Thr
210

<210> 4

<211> 210

<212> PRT

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

<400> 4

ES 2 761 583 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Thr
 210

<210> 5

<211> 1622

<212> ADN

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

<220>

<221> CDS

ES 2 761 583 T3

cct aag ccg aac cgc cgt aac gta agg gta agc gac gac cct cag acg	929
Pro Lys Pro Asn Arg Arg Asn Val Arg Val Ser Asp Asp Pro Gln Thr	
110 115 120	
gtg gtg gct cgt cgg cgt aga gaa agg ata agc gag aag atc cgg ata	977
Val Val Ala Arg Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile	
125 130 135	
ttg aag agg atg gtg cca ggc ggt gca aag atg gac act gcc tcc atg	1025
Leu Lys Arg Met Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met	
140 145 150 155	
ctc gac gaa gcc atc cgc tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg	1073
Leu Asp Glu Ala Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg	
160 165 170	
cta gct tct tca gcc tca cac tca gct tgg agc tcc tat gtc tga	1118
Leu Ala Ser Ser Ala Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val	
175 180 185	
cccttcttgc ctttgttatt accacaactc ggatacctaa ttataattct atcacgcggtt	1178
tcatgttgat atatatagat aaatggtcga ataaggattt cgatcgaaga ttgtatgtac	1238
aataaatgat gtgtgtatatt caattaatgt atgatatata tatatatatg tatgcagtat	1298
gcatttatat tctattctct ataaggaggc aacattgccg gattagggct ttgatcttat	1358
gcaagttttc cgaccaaaaa tatgaaatac ttgtttggat ataacatatg aatcggataa	1418
gtgttactag ttatataact ggaaaacaaa tgtctggaat aagaattccc gggagaacca	1478
agcctttctc taatccctaa gattatagct actgaaacaa tgaaacaatg aagaatcagt	1538
tgggcattag taaaaaaaaa agaatcagtt gggttgctta taaaattttg ttataaaatt	1598
tatgtcgtat gtgtgtagc cgta	1622

<210> 6

<211> 185

<212> PRT

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

<400> 6

5

ES 2 761 583 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val
 180 185

<210> 7

<211> 1593

<212> ADN

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

<220>

<221> CDS

<222> (497)..(1126)

<400> 7

ES 2 761 583 T3

tgccatacat aaccacggat catagtcgac acctcaacgt gaagcaaatt tgacaatcta	60
catacataac caacaaaaag tagaataccg tgaaaaccta aaccctaaaat atgatgtaaa	120
actcaagctt ggtccagagc ataaaaaaat taaagccatc gctttggtat cacatattta	180
aacgtcagtt tttttttggg gaagtaatat aaaaatataa ttaacaagaa aatttatgaa	240
ataattagca tgtaaaacac tagtcttttg gttgtgacaa aacgttttca caaatgttct	300
ataaataaat tcaagcacat tttatctgca aaatatatac tttcactcat aaaataagag	360
cgttttaaac attcatatac gcactacatt gacatgacaa aagaaatccg caaatacaaa	420
catatttagt tcggatatac ctaggaaata agactatatt atatatataa agaaattaga	480
aaaaaagaaa attggt atg tat aaa aga aag gtc tat gcg tct cta gtc caa	532
Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln	
1 5 10	
aaa ctc tat atg tct ggt tca aaa gca gat gca gca gcc ata gcc cca	580

ES 2 761 583 T3

Lys Leu Tyr Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro
15 20 25

ata gtc atg atg gag cct cat cat ctc ctt atg aac tgg aac aaa cct 628
Ile Val Met Met Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro
30 35 40

att gat ctc att aca caa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat ttc 676
Ile Asp Leu Ile Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe
45 50 55 60

atg gta gat cca cct tcc gaa acc cta agc cac ttc cag ccc ccg ccg 724
Met Val Asp Pro Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro
65 70 75

aca gtc ttc tcc gat ccc gga gga gga gag gaa gca gaa gac gaa gaa 772
Thr Val Phe Ser Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu
80 85 90

gga gag gaa gag ata gat gag atg aag gag atg caa tac gcg att gct 820
Gly Glu Glu Glu Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala
95 100 105

gcc atg cag ccc gta gac atc gat cca gcc acc gtt cct aag ccg aac 868
Ala Met Gln Pro Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn
110 115 120

cgc cgt aac gta agg gta agc gag gac ccc cag acg gtg gtg gct cgt 916
Arg Arg Asn Val Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg
125 130 135 140

cgg cgt aga gaa agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg 964
Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met
145 150 155

gtg cca gcc ggt gca aag atg gac act gcc tcc atg ctt gac gaa gcc 1012
Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala
160 165 170

atc cgc tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg ctt ctt cag cct 1060
Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro
175 180 185

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

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

gatatatata gataaatggt tgaataagga tttcgatcga agattgtatg gctattgatt 1216

acattatata ttgtacaata aatgatgtgt gtatttctat taatgtatat atgatatata 1276

tctgtttgca gtatgcattt atattctatt ctttataggg aggcaacatg ccggattagg 1336

gctttgatcg tatgcaagtt ttccgaccaa aaatatgaaa tacttgtttg gatataacat 1396

atgaatcgga taagtgttac tagttatata actggaaaaa attgtttgggt ataagaattc 1456

ccgggagaac caagcctttc tctaaccct aagatcatag ctactgaaat aatgaaaaa 1516

ES 2 761 583 T3

aacaaaaaaaa aaacaatgaa gaatcagttg ggcattagtc caaaaaaaaa aaagaatcag 1576

ttggattgct tataaaa 1593

<210> 8

<211> 210

<212> PRT

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

<400> 8

ES 2 761 583 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Thr
210

<210> 9
<211> 597
<212> ADN
<213> IND1 de Arabidopsis thaliana

5

<220>
<221> CDS

ES 2 761 583 T3

<222> (1)..(594)

<400> 9

atg gaa aat ggt atg tat aaa aag aaa gga gtg tgc gac tct tgt gtc	48
Met Glu Asn Gly Met Tyr Lys Lys Lys Gly Val Cys Asp Ser Cys Val	
1 5 10 15	
tcg tcc aaa agc aga tcc aac cac agc ccc aaa aga agc atg atg gag	96
Ser Ser Lys Ser Arg Ser Asn His Ser Pro Lys Arg Ser Met Met Glu	
20 25 30	
cct cag cct cac cat ctc ctc atg gat tgg aac aaa gct aat gat ctt	144
Pro Gln Pro His His Leu Leu Met Asp Trp Asn Lys Ala Asn Asp Leu	
35 40 45	
ctc aca caa gaa cac gca gct ttt ctc aat gat cct cac cat ctc atg	192
Leu Thr Gln Glu His Ala Ala Phe Leu Asn Asp Pro His His Leu Met	
50 55 60	
tta gat cca cct ccc gaa acc cta att cac ttg gac gaa gac gaa gag	240
Leu Asp Pro Pro Pro Glu Thr Leu Ile His Leu Asp Glu Asp Glu Glu	
65 70 75 80	
tac gat gaa gac atg gat gcg atg aag gag atg cag tac atg atc gcc	288
Tyr Asp Glu Asp Met Asp Ala Met Lys Glu Met Gln Tyr Met Ile Ala	
85 90 95	
gtc atg cag ccc gta gac atc gac cct gcc acg gtc cct aag ccg aac	336
Val Met Gln Pro Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn	
100 105 110	
cgc cgt aac gta agg ata agc gac gat cct cag acg gtg gtt gct cgt	384
Arg Arg Asn Val Arg Ile Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg	
115 120 125	
cgg cgt cgg gaa agg atc agc gag aag atc cga att ctc aag agg atc	432
Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Ile	
130 135 140	
gtg cct ggt ggt gcg aag atg gac aca gct tcc atg ctc gac gaa gcc	480
Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala	
145 150 155 160	
ata cgt tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg att ctt cag cct	528
Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Ile Leu Gln Pro	
165 170 175	
cac tct cag att gga gct cct atg gct aac ccc tct tac ctt tgt tat	576
His Ser Gln Ile Gly Ala Pro Met Ala Asn Pro Ser Tyr Leu Cys Tyr	
180 185 190	
tac cac aac tcc caa ccc tga	597
Tyr His Asn Ser Gln Pro	
195	

<210> 10

<211> 198

<212> PRT

<213> IND1 de Arabidopsis thaliana

<400> 10

5

ES 2 761 583 T3

Met Glu Asn Gly Met Tyr Lys Lys Lys Gly Val Cys Asp Ser Cys Val
 1 5 10 15

Ser Ser Lys Ser Arg Ser Asn His Ser Pro Lys Arg Ser Met Met Glu
 20 25 30

Pro Gln Pro His His Leu Leu Met Asp Trp Asn Lys Ala Asn Asp Leu
 35 40 45

Leu Thr Gln Glu His Ala Ala Phe Leu Asn Asp Pro His His Leu Met
 50 55 60

Leu Asp Pro Pro Pro Glu Thr Leu Ile His Leu Asp Glu Asp Glu Glu
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Ile Leu Gln Pro
 165 170 175

His Ser Gln Ile Gly Ala Pro Met Ala Asn Pro Ser Tyr Leu Cys Tyr
 180 185 190

Tyr His Asn Ser Gln Pro
 195

<210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> oligonucleótido de detección de IND-A1-EMS06 y -WT

<400> 11
 cgtaagggta agcgacgacc ctcagacgt

29

10

<210> 12

ES 2 761 583 T3

	<211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> oligonucleótido de detección de IND-A1-EMS06	
	<400> 12 atggtggctc gtcg	14
10	<210> 13 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido de detección de IND-A1-WT	
15	<400> 13 gtggtggctc gtc	13
	<210> 14 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido de detección de IND-A1-EMS09 y -WT	
	<400> 14 ggaggcagtg tccatcttg caccgca	27
25	<210> 15 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido de detección de IND-A1-EMS09	
30	<400> 15 ttggcaccat cctct	15
35	<210> 16 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido de detección de IND-A1-WT	
40	<400> 16 ctggcaccat cctct	15
	<210> 17 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> oligonucleótido de detección de IND-A1-EMS13 y -WT	
	<400> 17 cctgccgttt caagaacttg gtgtagcgga tgt	33
50	<210> 18 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	

ES 2 761 583 T3

	<220>	
	<223> oligonucleótido de detección de IND-A1-EMS13	
	<400> 18	
	acttcgtcga gcatg	15
5	<210> 19	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> oligonucleótido de detección de IND-A1-WT	
	<400> 19	
	gcttcgtcga gcatg	15
	<210> 20	
15	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de detección de IND-C1-EMS04 y -WT	
	<400> 20	
20	catcctcttc aatatccgga tcttctcgct tacccttct ctact	45
	<210> 21	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> oligonucleótido de detección de IND-C1-EMS04	
	<400> 21	
	accgacgagc cac	13
	<210> 22	
30	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de detección de IND-C1-WT	
35	<400> 22	
	gccgacgagc cac	13
	<210> 23	
	<211> 26	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de detección de IND-C1-EMS08 y -WT	
	<400> 23	
	cgtaagggta agcgaggacc cccaga	26
45	<210> 24	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> oligonucleótido de detección de IND-C1-EMS08	

ES 2 761 583 T3

5	<p><400> 24 tgggtggtggc tcg</p> <p><210> 25 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial</p> <p><220> <223> oligonucleótido de detección de IND-C1-WT</p>	13
10	<p><400> 25 cggtggtggc tcg</p> <p><210> 26 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial</p> <p><220> <223> oligonucleótido de detección de IND-C1-EMS09 y -WT</p>	13
15	<p><400> 26 cgaggacccc cagacggtgg tgt</p> <p><210> 27 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial</p> <p><220> <223> oligonucleótido de detección de IND-C1-EMS09</p>	23
20	<p><400> 27 actcgtcggc gtag</p> <p><210> 28 <211> 12 <212> ADN <213> Artificial</p> <p><220> <223> oligonucleótido de detección de IND-C1-WT</p>	14
25	<p><400> 28 gctcgtcggc gt</p>	12
30		
35		

REIVINDICACIONES

1. Un alelo mutante defectivo parcial de un gen *IND*, en el que el gen *IND* comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 (a) una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 desde el nucleótido en la posición 46 hasta el nucleótido en la posición 633, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7;
 (b) una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 hasta el aminoácido en la posición 210, o la SEQ ID NO: 4,

10 en el que dicho alelo mutante defectivo parcial comprende una o más mutaciones de sentido erróneo en la secuencia de ácido nucleico de dicho gen *IND* que da como resultado la producción de una proteína *IND* en la que al menos un aminoácido seleccionado del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 124 de SEQ ID NO:2, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 146 de la SEQ ID NO:2, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 159 de la SEQ ID NO:2, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 136 de la SEQ ID NO:4, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 139 de la SEQ ID NO:4 o el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 142 de la SEQ ID NO:4, está sustituido con otro aminoácido.

2. Un alelo mutante de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 20 - un alelo *IND* que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 en la que la G en la posición 370 está sustituida por A;
 - un alelo *IND* que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 en la que la G en la posición 436 está sustituida por A;
 - un alelo *IND* que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 en la que la C en la posición 476 está sustituida por T;
 - un alelo *IND* que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 en la que la C en la posición 407 está sustituida por T;
 - un alelo *IND* que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 en la que la G en la posición 415 está sustituida por A; y
 - un alelo *IND* que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 en la que la C en la posición 424 está sustituida por T.

25 3. Un alelo mutante de acuerdo con la reivindicación 1, que se deriva de una planta de una especie de *Brassica*, preferentemente de una especie de cultivo de *Brassica* o una especie de semilla oleosa de *Brassica*.

4. Una proteína *IND* mutante codificada por un alelo mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

30 5. Un procedimiento de identificación de un alelo *IND* mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en una muestra biológica que comprende determinar la presencia de una región específica de *IND* mutante en un ácido nucleico presente en la muestra biológica.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además someter la muestra biológica a un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa usando un conjunto de al menos dos cebadores, estando dicho conjunto seleccionado del grupo que consiste en:

- 35 - un conjunto de cebadores, en el que uno de dichos cebadores reconoce específicamente la región flanqueante en 5' del alelo *IND* mutante y el otro de dichos cebadores reconoce específicamente la región flanqueante en 3' del alelo *IND* mutante, respectivamente,
 - un conjunto de cebadores, en el que uno de dichos cebadores reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y el otro de dichos cebadores reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante,
 40 - un conjunto de cebadores, en el que uno de dichos cebadores reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y el otro de dichos cebadores reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente.

45 7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además someter la muestra biológica a un ensayo de hibridación usando un conjunto de sondas específicas que comprenden al menos una sonda específica, estando dicho conjunto seleccionado del grupo que consiste en:

- un conjunto de sondas específicas, en el que una de dichas sondas reconoce específicamente la región flanqueante en 5' del alelo *IND* mutante y la otra de dichas sondas reconoce específicamente la región flanqueante en 3' del alelo *IND* mutante,
 50 - un conjunto de sondas específicas, en el que una de dichas sondas reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y la otra de dichas sondas reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante,
 - un conjunto de sondas específicas, en el que una de dichas sondas reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y la otra de dichas sondas reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente,
 55 - una sonda específica que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante.

8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que

- 5 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 929 o del 931 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 930 de SEQ ID NO: 5 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 930 o del 930 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente, o
- 10 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 995 o del 997 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 996 de SEQ ID NO: 5 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 996 o del 996 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente o
- 15 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 1035 o del 1037 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 1036 de SEQ ID NO: 5 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 1036 o del 1036 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente o
- 20 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 902 o del 904 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 903 de SEQ ID NO: 7 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 903 o del 903 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente o
- 25 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 910 o del 912 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 911 de SEQ ID NO: 7 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 911 o del 911 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente o
- 30 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 919 o del 921 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 920 de SEQ ID NO: 7 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 920 o del 920 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente.

9. Un procedimiento para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una planta o célula, parte, semilla o progenie de la misma, que comprende determinar la presencia de un mutante y/o una región específica de *IND* de tipo salvaje correspondiente en el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma.

10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el procedimiento comprende además someter el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, a un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa usando un conjunto de al menos dos o al menos tres cebadores, en el que al menos dos de dichos cebadores reconocen específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje, estando dichos al menos dos cebadores seleccionados del grupo que consiste en:

- 45 - un primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 3' o 5' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, respectivamente,
- un primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje,
- un primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante de tipo salvaje, respectivamente, y

en el que al menos dos de dichos cebadores reconocen específicamente el alelo *IND* mutante, estando dichos al menos dos cebadores seleccionados del grupo que consiste en:

- 50 - el primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un segundo cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 3' o 5' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, respectivamente,
- 55 - el primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del mutante del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un tercer cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante,
- el primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y un tercer cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente.

11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el procedimiento comprende además someter el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, a un ensayo de hibridación usando

un conjunto de al menos dos sondas específicas, en el que al menos una de dichas sondas específicas reconoce específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje, dicha al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 - una primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y una segunda sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 3' o 5' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, respectivamente,
- una primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y una segunda sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje,
- 10 - una primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y una segunda sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante de tipo salvaje, respectivamente,
- una sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, y

en el que al menos una de dichas sondas específicas reconoce específicamente el alelo *IND* mutante, dicha al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- 15 - la primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y la segunda sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 3' o 5' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, respectivamente,
- la primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del mutante del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y una tercera sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante,
- 20 - la primera sonda que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y de tipo salvaje, y una tercera sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante,
- una sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante.

25 12. Un kit para identificar un alelo *IND* mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una muestra biológica, que comprende un conjunto de cebadores o sondas, estando dicho conjunto seleccionado del grupo que consiste en:

- un conjunto de cebadores o sondas, en el que una de dichos cebadores o sondas reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y la otra de dichas sondas reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante,
- 30 - un conjunto de cebadores o sondas, en el que uno de dichos cebadores reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante y el otro de dichos cebadores o sondas reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente,
- una sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante,
- 35 y en la que
- dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 929 o del 931 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 930 de SEQ ID NO: 5 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 930 o del 930 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente o
- 40 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 995 o del 997 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 996 de SEQ ID NO: 5 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 996 o del 996 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente o
- 45 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 1035 o del 1037 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 1036 de SEQ ID NO: 5 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 1036 o del 1036 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente o
- 50 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 902 o del 904 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 903 de SEQ ID NO: 7 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 903 o del 903 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente o
- 55 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 910 o del 912 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 911 de SEQ ID NO: 7 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 911 o del 911 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente o
- 60 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido

1 al 919 o del 921 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 920 de SEQ ID NO: 7 o del complementario del mismo; y dicha región de unión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 920 o del 920 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente.

5 13. Un kit de acuerdo con la reivindicación 12, en el que

- dicho cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante puede consistir en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la región flanqueante en 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del complementario del mismo, respectivamente o

10 - dicho cebador que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento del mismo, o

15 - dicho cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre los 5' o región flanqueante 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento del mismo, en el que dichos 17 a 200 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de la mutación o las secuencias flanqueantes,

20 - dicha sonda que reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' del alelo *IND* mutante, consiste en una secuencia de nucleótidos de 13 a 1000 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia flanqueante 5' o 3' del alelo *IND* mutante o del complemento del mismo, respectivamente, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma, o

- dicha sonda que reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante, consiste en una secuencia de nucleótidos de 13 a 1000 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación del alelo *IND* mutante o del complemento del mismo, o una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con el mismo, o

25 - dicha sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante en 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, consiste en una secuencia de nucleótidos de 13 a 1000 nucleótidos consecutivos seleccionados de una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante o salvaje o del complementario del mismo, respectivamente, en el que dichos 13 a 1.000 nucleótidos consecutivos no derivan exclusivamente de la mutación o las secuencias flanqueantes o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 % con el mismo.

35 14. Un kit para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, que comprende un conjunto de cebadores o sondas, en el que al menos dos de dichos cebadores o al menos una de dichas sondas reconocen específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje y en el que al menos dos de dichos cebadores o al menos una de dichas sondas reconocen específicamente el alelo *IND* mutante, seleccionado del grupo que consiste en:

- un conjunto de al menos tres cebadores o sondas, en el que un primer cebador o sonda reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' del mutante y el alelo *IND* de tipo salvaje, un segundo cebador o sonda reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* mutante, y un tercer cebador o sonda reconoce específicamente la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje,

40 - un conjunto de al menos tres cebadores o sondas, en el que un primer cebador o sonda reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' del mutante y el alelo *IND* de tipo salvaje, un segundo cebador o sonda reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* mutante, respectivamente, y un tercer cebador o sonda reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 3' o 5' y la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje, respectivamente,

45 - un conjunto de al menos dos sondas, en el que una primera sonda reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación del alelo *IND* mutante y una segunda sonda reconoce específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' o 3' y la región de mutación de el alelo *IND* de tipo salvaje, y en la que

50 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 929 o del 931 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 930 de la SEQ ID NO: 5 o de la complementaria del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante tiene la secuencia a o la complementaria de la misma; dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 930 o del 930 al 1622 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 929 seguido de a o a seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 931 al 1622 o de la complementaria del mismo, respectivamente o

60 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 995 o del 997 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 996 de la SEQ ID NO: 5 o de la complementaria de del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante tiene la secuencia a o la complementaria de la misma; dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la

SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 996 o del 996 al 1622 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 995 seguido de a o a seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 997 al 1622 o de la complementaria del mismo, respectivamente o

5 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 1035 o del 1037 al 1622 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 1036 de la SEQ ID NO: 5 o de la complementaria de del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante tiene la secuencia t o la complementaria de la misma; dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 1036 o del 1036 al 1622 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 del nucleótido 1 al 1035 seguido de t o t seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 desde el nucleótido 1037 al 1622 o de la complementaria del mismo, respectivamente o

10 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 902 o del 904 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 903 de la SEQ ID NO: 7 o de la complementaria de del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia t o la complementaria de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 903 o del 903 al 1593 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 902 seguido de t o t seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 904 al 1593 o de la complementaria del mismo, respectivamente o

15 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 910 o del 912 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 911 de la SEQ ID NO: 7 o de la complementaria de del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante tiene la secuencia a o la complementaria de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 911 o del 911 al 1593 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 910 seguido de a o a seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 912 al 1593 o de la complementaria del mismo, respectivamente o

20 - dicha región flanqueante en 5' o 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 919 o del 921 al 1593 o el complementario del mismo, respectivamente; dicha región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje tiene la secuencia de nucleótidos del nucleótido 920 de la SEQ ID NO: 7 o de la complementaria de del mismo; dicha región de mutación del alelo *IND* mutante puede tener la secuencia t o la complementaria de la misma; y dicha región de unión del alelo *IND* de tipo salvaje puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 920 o del 920 al 1593 o de la complementaria de la misma, respectivamente; y dicha región de unión del alelo *IND* mutante comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 del nucleótido 1 al 919 seguido de t o t seguida de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 desde el nucleótido 921 al 1593 o de la complementaria del mismo, respectivamente.

15. Un procedimiento para aumentar el rendimiento de la planta de Brassica que comprende al menos dos genes *IND*, que comprende introducir por mutagénesis dos alelos *IND* homocigotos mutantes como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en su genoma.

45 16. Uso de un alelo *IND* mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para aumentar el rendimiento de semilla o la resistencia al desgranado de las vainas en una planta de *Brassica*.

17. Un procedimiento para alterar las propiedades de dehiscencia del fruto de una planta de Brassica que comprende al menos dos genes *IND*, que comprende las etapas de:

50 - generar y/o seleccionar una planta de Brassica que comprenda al menos dos genes *IND*, en el que al menos dos alelos de los al menos dos genes *IND* son alelos *ind* defectivos parciales como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,

- seleccionar una planta con propiedades alteradas de dehiscencia del fruto, en particular, una planta en la que el desgranado de semillas se reduce o retrasa hasta después de la cosecha, mientras que las vainas mantienen al mismo tiempo una capacidad de trillado agrónomicamente relevante,

en el que dichos alelos *ind* defectivos parciales se generan por mutagénesis.