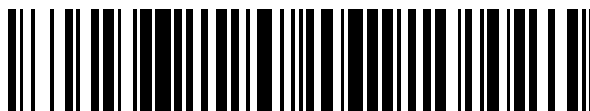


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 128**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2013** **PCT/EP2013/053845**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013** **WO13127809**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2013** **E 13708382 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020** **EP 2820037**

54 Título: **Modulación del vigor de las semillas**

30 Prioridad:

29.02.2012 EP 12157514

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2020

73 Titular/es:

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)
Rosentalstrasse 67
4058 Basel, CH

72 Inventor/es:

FINCH-SAVAGE, WILLIAM, EDWARD;
MORRIS, KARL;
BARKER, GUY, CAMERON;
BRUGGINK, TONKO, GERHARD y
VAN DEN WIJNGAARD, PAUL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 788 128 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

Modulación del vigor de las semillas

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere en general a un polinucleótido que posibilita la modulación del vigor de las semillas, particularmente potencia el vigor de las semillas, y más particularmente posibilita la modificación de la velocidad de germinación. La invención también se refiere a una semilla de una planta que comprende dicho polinucleótido. Además, también se proporcionan dentro de la presente invención un método transgénico de producción de la semilla de la planta para mejorar la germinación y el vigor de la semilla de la planta, la planta transgénica y el uso del polinucleótido de la invención para producir plantas que generan semillas con germinación y características de vigor mejoradas. Las plantas de la presente invención se refieren particularmente a *Brassica*, más particularmente a *Brassica oleracea*.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La calidad de las semillas, que se define por el número de plantas útiles uniformes que se obtienen de un lote de semillas, está llegando a ser un rasgo cada vez más importante en los mercados de horticultura desarrollados. El desarrollo de plantas jóvenes es una actividad altamente tecnológica en estos mercados y las demandas con respecto a la calidad de las semillas, por lo tanto, son altas. Se requiere una calidad de las semillas fiable y constantemente alta para esto. Además, la germinación en condiciones adversas es un rasgo de calidad importante de las semillas. Esto significa que un requisito para el éxito comercial de variedades de semillas es una calidad constante y robusta de las semillas. Actualmente, sin embargo, la calidad de las semillas de variedades comerciales no siempre es estable y predecible.

Los parámetros de calidad de las semillas se ven muy influidos por las condiciones ambientales maternas durante el desarrollo de las semillas. Dados los volúmenes de semillas necesarios y la viabilidad comercial, son posibles únicamente controles limitados de estas condiciones. Por lo tanto, la constancia de la calidad de las semillas está limitada por la susceptibilidad a las condiciones maternas. Las investigaciones han mostrado que el entorno materno puede afectar potencialmente a todos los parámetros de calidad de las semillas, incluyendo la uniformidad y la germinación en condiciones adversas. Por lo tanto, disminuir la influencia de las condiciones maternas daría lugar a una calidad más constante y robusta de las semillas, lo que proporciona ventajas en los mercados tanto desarrollados como en desarrollo.

El establecimiento de plántulas predecibles y uniformes es esencial para la producción de cultivos que sean tanto sostenibles como provechosos. Un contribuyente clave a esta previsibilidad es el rendimiento de germinación de las semillas, que se ve influido directamente por el letargo y el vigor de las semillas. El letargo *per se* (ausencia de germinación en condiciones en general permisibles) no se considera un problema práctico con muchas especies de cultivo, pero el bajo vigor de las semillas (poco rendimiento de las semillas en la práctica) influye enormemente no solo en el número de plántulas que brotan, sino también en la cronología y uniformidad del brote de las plántulas en todos los cultivos. Los efectos de esto tienen un impacto principal sobre muchos aspectos de producción de cultivos que determinan la rentabilidad y las inversiones requeridas, y también hay influencias directas específicas de cultivo sobre la producción comercializable (Finch-Savage, 1995). El bajo vigor de las semillas puede ser el resultado de deterioro o daño de muchos tipos en las semillas y esto tiene gran importancia comercial. Sin embargo, también hay diferencias inherentes en el vigor inicial de las semillas antes de que empiecen a deteriorarse, pero la base genética, molecular y fisiológica de esto sigue estando poco comprendido.

Se han identificado mutaciones en muchos genes que muestran fenotipos con rendimiento alterado de la germinación de las semillas y estas han sido decisivas en el desarrollo de nuestra comprensión actual del control de la germinación (revisado por Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Holdsworth *et al.*, 2008a y 2008b). Sin embargo, el impacto relativo de estos genes en semillas de tipo silvestre o de cultivo está poco comprendido y no se han revelado candidatos claros que formen la base de un ensayo discriminador para el vigor de las semillas. Una fuente alternativa de variación genética para mutaciones inducidas en laboratorio está disponible en poblaciones naturales y genotipos de cultivo. Usar esta variación para identificar QTL asociados con el vigor de las semillas y después genes candidatos que influyan en estos rasgos puede proporcionar una ruta para identificar genes esencialmente importantes.

Se ha explotado la variación tanto de plantas naturales como de plantas de cultivo en análisis genéticos cuantitativos de una serie de rasgos de vigor de las semillas en tomate (Foolad *et al.*, 1999), *Brassica oleracea* (Betley *et al.*, 2000, Finch-Savage *et al.*, 2005) y *Arabidopsis* (Groot *et al.*, 2000, Clerkx *et al.*, 2004). La velocidad de QTL de germinación de las semillas se ha identificado en las tres especies.

La distinción entre el letargo y el bajo vigor de las semillas en semillas sanas no envejecidas en términos de velocidad de germinación, si existe alguna, no se comprende y puede tener la misma base (Hilhorst y Toorop, 1997). En la mayoría de situaciones, por ejemplo, en *Arabidopsis*, el letargo fisiológico no es absoluto, pero las semillas son condicionalmente letárgicas, es decir, la germinación tiene a ser lenta y es posible únicamente en una serie limitada

de entornos. Como el letargo se pierde progresivamente, la germinación tiende a acelerarse y llega a ser posible en una serie más amplia de entornos y, por lo tanto, puede aparecer como un aumento en el vigor.

Entre los factores que explican el establecimiento de la germinación de las semillas y la regulación del letargo de las semillas, el ácido abscísico (ABA), una hormona vegetal bien conocida, desempeña una función importante. El ABA es en particular esencial para la germinación de las semillas y los procesos de maduración de las semillas (para una revisión, véase Finkelstein *et al.* 2002), ya que es responsable del establecimiento de un periodo de letargo de las semillas. En cuanto a las yemas, es importante que las semillas no germinan prematuramente, por ejemplo, durante condiciones inoportunamente suaves antes del comienzo del invierno o una estación seca. El ABA en la semilla impone este letargo. El letargo se suprime únicamente si la semilla se ha expuesto a un episodio de frío prolongado y/u otra señal ambiental apropiada y si hay suficiente agua para mantener la germinación. Además de su función en el vigor de las semillas, el ABA también regula muchos aspectos importantes de la vida de la planta, incluyendo las respuestas fisiológicas a amenazas bióticas y agresiones abióticas como sequía y desecación.

Por tanto, hay una necesidad permanente de semillas con un vigor más fiable y constante de las semillas; especialmente con una velocidad oportuna y uniforme de germinación, para proporcionar semillas que germinen a una tasa más constante, independientemente de las condiciones maternas y sean cuales sean las condiciones ambientales externas. Dicho vigor aumentado de las semillas sería de particular interés en casos donde la semilla se recubre con una preparación dada (química, biológica), ya que habitualmente se observa un retardo en la germinación de las semillas. En consecuencia, las semillas que comprenden secuencias que potencian el vigor de las semillas, más particularmente potencian la velocidad y la uniformidad de la germinación de las semillas, serían de importancia fundamental para contrarrestar el efecto del tratamiento de recubrimiento, mientras aún se aplican insecticidas y fungicidas.

Además, aunque en muchos aspectos, aumentar el vigor de las semillas sería un rasgo muy útil y deseado, parece que, en algunos casos, disminuir el vigor de las semillas sería de gran interés. En particular en semillas vivíparas, disminuir el vigor de las semillas podría ser beneficioso. La viviparidad se define como la germinación de la semilla mientras aún está en la planta madre o antes de secarse y puede producirse tanto en semillas inmaduras como en semillas completamente maduras. La viviparidad se ha observado en muchas especies de cultivo diferentes incluyendo cultivos de *Brassica* (Ruan *et al.* 2000). Las semillas que comprenden secuencias que pueden disminuir el vigor de las semillas, por tanto, pueden retardar, si no eliminar, el fenotipo de viviparidad no deseado.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Por lo tanto, es mérito de los autores de la invención, en dicho estado de la técnica, haber identificado una planta de una población que contenía una pequeña región de introgresión que abarca *SOG1* (*Speed Of Germination 1* - velocidad de germinación 1), un QTL de velocidad de germinación de las semillas identificado en *B. oleracea* por Bettey *et al.* (2000) y particularmente haber demostrado e identificado los genes correspondientes que están implicados en la modulación del vigor de las semillas, en particular implicados en la regulación de la velocidad de germinación de las semillas. En particular se demuestra que estos genes, y sus secuencias correspondientes, pueden usarse como herramientas posibilitadoras para obtener semillas transgénicas (o plantas transgénicas que suministran semillas) que muestran un fenotipo de vigor modificado de las semillas. En particular, pueden introducirse secuencias génicas mediante técnicas de transformación de plantas en un nuevo fondo para modular el vigor de las semillas. Más particularmente, pueden usarse secuencias génicas para genomanipular una planta novedosa, cuyas semillas brotarán más pronto, más uniformemente, independientemente de las condiciones ambientales externas, y con independencia de las condiciones maternas. Además, dichas secuencias génicas pueden usarse como herramientas para modificar el contenido de ABA en la semilla y/o la respuesta de la semilla a ABA, influyendo de ese modo al comportamiento de la semilla con respecto al letargo de la semilla y la síntesis de proteínas y lípidos de almacenamiento en la semilla.

Por lo tanto, una realización de la invención es proporcionar un polinucleótido, particularmente un polinucleótido aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en

a. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 3 (GD33 versión de BolC.VG1.a);

b. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos cuya hebra complementaria hibrida con la molécula de ácido nucleico de a);

c. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se desvía de la secuencia de nucleótidos definida en a) o b) por la degeneración del código genético;

en el que dicha molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de a) – c), tras la expresión en una planta de *Brassica* o parte de la planta, da lugar a un vigor aumentado de las semillas en comparación con una planta de *Brassica* o parte de la planta que no comprende dicha molécula de ácido nucleico.

ASPECTOS DE LA DIVULGACIÓN

En un 1.^{er} aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido, particularmente un polinucleótido aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en

- 5
- a. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 1 (A12 versión de BolC.VG1.a);
 - b. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 2 (A12 versión de BolC.VG2.a);
 - 10 c. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 3 (GD33 versión de BolC.VG1.a);
 - d. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 4 (GD33 versión de BolC.VG2.a);
 - 15 e. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos cuya hebra complementaria hibrida con la molécula de ácido nucleico de cualquiera de a) – d);
 - f. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se desvía de la secuencia de nucleótidos definida en cualquiera de a) – e) por la degeneración del código genético;
- en el que dicha molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de a) – f), tras la expresión en una planta o parte de la planta, da lugar a un vigor modificado de las semillas.

- 20
- En un 2.^o aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido, particularmente un polinucleótido aislado, de acuerdo con el aspecto 1, que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste además en
- 25 a. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 5 (alelo A12 truncado de BolC.VG2.b);
 - b. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 6 (alelo GD33 truncado de BolC.VG2.b);
 - c. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos cuya hebra complementaria hibrida con la molécula de ácido nucleico de cualquiera de a) – b);
 - 30 d. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se desvía de la secuencia de nucleótidos definida en cualquiera de a) – c) por la degeneración del código genético;
- en el que dicha molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de a) – d), tras la expresión en una planta o parte de la planta, da lugar a un vigor modificado de las semillas.

- 35
- En un 3.^{er} aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido, particularmente un polinucleótido aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en
- a. molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias representadas en el grupo que comprende: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6;
 - 40 b. molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias representadas en el grupo que comprende: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6;
 - c. molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 98 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias representadas en el grupo que comprende: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6;
 - 45 d. molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos cuya hebra complementaria hibrida con la molécula de ácido nucleico de cualquiera de a) – c);
 - e. molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se desvía de la secuencia de nucleótidos definida en cualquiera de a) – d) por la degeneración del código genético;
 - 50 en el que dicha molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de a) – e), tras la expresión en una planta o parte de la planta, da lugar a un vigor modificado de las semillas.

En un 4.º aspecto, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspecto, en el que el fenotipo de vigor modificado de las semillas se caracteriza por un fenotipo adicional seleccionado del grupo que comprende: velocidad modificada de germinación, velocidad modificada de brote de plántulas, uniformidad modificada de germinación de las semillas, uniformidad modificada de brote de plántulas, porcentaje modificado de germinación de las semillas, tolerancia modificada de la semilla frente al entorno externo y/o condiciones maternas, sensibilidad modificada a ABA o contenido modificado de ABA.

En un 5.º aspecto, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido, particularmente un polinucleótido aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que comprende:

a. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 3;

b. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 4;

c. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 6;

d. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos cuya hebra complementaria hibrida con la molécula de ácido nucleico de cualquiera de a) – c);

e. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se desvía de la secuencia de nucleótidos definida en cualquiera de a) – d) por la degeneración del código genético;

en el que dicha molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de a) – e), tras la expresión en una planta o parte de la planta, da lugar a un vigor aumentado de las semillas.

En el contexto de la presente invención, la expresión "vigor aumentado de las semillas" significa que la velocidad de germinación de la semilla puede modificarse en el sentido de que la semilla germina más rápido y, por tanto, es más vigorosa. En un aspecto particular, la velocidad de germinación se aumenta permitiendo que se obtengan semillas que germinan más rápido gracias a la presencia de un polinucleótido de acuerdo con los presentes aspectos en su genoma en comparación con una semilla que no comprende dicho polinucleótido. Dicha velocidad aumentada de germinación provoca un brote de plántulas anterior significativo y, por tanto, proporciona a las semillas una flexibilidad potenciada y una mejor adaptación a diversos entornos. Se descubrió que los 2 genes que se identificaron tenían un fenotipo de germinación significativo, lo que indica que estos genes son reguladores de la germinación en diferente grado. El alelo correspondiente al polinucleótido de la SEQ ID NO: 3 (alelo GD33 del gen) de acuerdo con la presente invención se ha demostrado que corresponde al fenotipo de vigor aumentado de las semillas y, por tanto, permite modificar la velocidad de germinación de las semillas de la planta en que se introduce hacia una velocidad aumentada de germinación.

En un 6.º aspecto, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido de acuerdo con el aspecto 5, en el que el fenotipo de vigor aumentado de las semillas se caracteriza por un fenotipo adicional seleccionado del grupo que comprende: velocidad aumentada de germinación, velocidad aumentada de brote de plántulas, uniformidad aumentada de germinación de las semillas, uniformidad aumentada de brote de plántulas, porcentaje aumentado de germinación de las semillas, tolerancia aumentada de la semillas frente al entorno externo y/o condiciones maternas, sensibilidad disminuida a ABA o contenido disminuido de ABA.

En un 7.º aspecto, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido, particularmente un polinucleótido aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que comprende:

a. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 1;

b. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 2;

c. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 5;

d. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos cuya hebra complementaria hibrida con la molécula de ácido nucleico de cualquiera de a) a c);

e. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se desvía de la secuencia de nucleótidos definida en cualquiera de a) – d) por la degeneración del código genético;

en el que dicha molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de a) – e), tras la expresión en una planta o parte de la planta, da lugar a un vigor disminuido de las semillas.

En un 8.º aspecto, la presente divulgación proporciona un casete de expresión que comprende un polinucleótido de cualquiera de los aspectos precedentes.

- 5 En un 9.º aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de vector que comprende el casete de expresión de acuerdo con el 8.º aspecto.

En un 10.º aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de un polinucleótido de acuerdo con los aspectos 1 a 3 para modificar el vigor de las semillas.

- 10 En un 11.º aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para modificar el vigor de las semillas, que comprende introgresión a través de cruce o por técnicas de transformación de plantas para ello y expresar en una planta o parte de la planta un polinucleótido, un casete de expresión o una molécula de vector de cualquiera de los aspectos 1 a 10.

- 15 En un 12.º aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para producir semillas con vigor modificado de las semillas, que comprende:

- a. obtener una primera planta que se ha verificado que contiene el polinucleótido de cualquiera de los aspectos 1 a 7;
20 b. cruzar dicha primera planta con una segunda planta que se ha verificado que carece de dicho polinucleótido; y
c. identificar una semilla de la planta resultante del cruce, que muestra un vigor modificado de las semillas en comparación con semillas suministradas por la segunda planta.

- 25 En un 13.º aspecto, la presente divulgación se refiere a una planta o parte de la planta que contiene dentro de su genoma una introgresión que comprende el polinucleótido, el casete de expresión o la molécula de vector de cualquiera de los aspectos 1 a 9 y muestra una modificación del vigor de las semillas en comparación con una planta o parte de la planta que no comprende dicho polinucleótido, casete de expresión o molécula de vector.

- 30 En un 14.º aspecto, la presente divulgación se refiere a una planta o parte de la planta que contiene dentro de su genoma una introgresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con el aspecto 5 y muestra un vigor aumentado de las semillas en comparación con una semilla suministrada por una planta o parte de la planta que no comprende dicho polinucleótido.

- 35 En un 15.º aspecto, la presente divulgación se refiere a una planta o parte de la planta que contiene dentro de su genoma una introgresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con el aspecto 7 y muestra un vigor disminuido de las semillas en comparación con una semilla suministrada por una planta o parte de la planta que no comprende dicho polinucleótido.

- 40 En un 16.º aspecto, la divulgación proporciona un método para seleccionar una planta o parte de la planta con vigor modificado de las semillas, que comprende la detección en la planta o parte de la planta a ensayar de la presencia o ausencia de un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 7.

- 45 En un 17.º aspecto, la divulgación proporciona un método para seleccionar una planta o parte de la planta con vigor modificado de las semillas, que comprende poner en contacto una planta candidata o parte de la planta con una herramienta de selección seleccionada del grupo que comprende los polinucleótidos de cualquiera de los aspectos 1 a 7.

- 50 En un 18.º aspecto, la presente divulgación se refiere una planta o parte de la planta de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes que es una planta cultivada o parte de la planta cultivada y se seleccionada del grupo que comprende *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica campestris*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Brassica pekinensis*, *Brassica chinensis*, *Brassica rosularis*, *Eruca vesicaria*, *Eruca sativa*, *Raphanus sativus*, *Lepidium sativum*, *Nasturtium officinale*, *Wasabia japonica*.

- 55 En un 19.º aspecto, la divulgación proporciona un método no biológico para obtener una planta o parte de la planta con vigor modificado de las semillas, que comprende introducir un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 7 en el genoma de dicha planta o parte de la planta.

- 60 En un aspecto 20, la divulgación se refiere al método de acuerdo con el aspecto n.º 16, que comprende (a) obtener una primera planta que se ha verificado que contiene el polinucleótido de cualquiera de los aspectos 1 a 7; (b) cruzar dicha primera planta con una segunda planta que se ha verificado que carece de dicho polinucleótido; y (c) identificar una planta resultante del cruce, que muestra vigor modificado de las semillas, y que contiene dicho polinucleótido.

En un aspecto 21, la divulgación se refiere al método de acuerdo con el aspecto 20, en el que la presencia del polinucleótido se verifica mediante el uso de un marcador molecular, particularmente mediante un marcador molecular físicamente localizado en una posición que está dentro o fuera del locus genético que contiene el polinucleótido.

5 En un aspecto 22, la divulgación se refiere al método de acuerdo con el aspecto 20, en el que la presencia del polinucleótido se verifica mediante el uso de al menos dos marcadores moleculares, particularmente mediante al menos dos marcadores moleculares físicamente localizados en una posición que está flanqueando el locus genético que contiene el polinucleótido.

10 En un aspecto 23, la divulgación se refiere a una semilla que comprende un polinucleótido de acuerdo con los aspectos 1 a 7, en la que dicha semilla está recubierta con cualquier tipo de recubrimiento.

En un aspecto 24, la divulgación se refiere a una planta o parte de la planta de acuerdo con los aspectos 13 a 18, en la que la planta es una planta híbrida.

15 En un aspecto 25, la divulgación se refiere a una planta o parte de la planta de acuerdo con el aspecto 24 que se puede obtener de la semilla depositada en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41951, o la descendencia de la misma.

20 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Las secuencias polinucleotídicas de acuerdo con la realización previa se han identificado en y aislado de una planta de *Brassica oleracea* con diferentes fenotipos de vigor de las semillas. Los alelos con las secuencias polinucleotídicas de acuerdo con la presente invención se sometieron a introgresión en una planta con diferente calidad de las semillas y diferente vigor de las semillas. Gracias a la introgresión de cualquiera de las secuencias polinucleotídicas de acuerdo con la presente invención, el vigor de las semillas se modifica significativamente y, por consiguiente, la calidad de la planta o parte de la planta, particularmente la calidad de las semillas de la planta se modificó significativamente, particularmente el vigor de las semillas, que destaca por la velocidad de germinación. En una realización, la semilla podía germinar mejor y más rápido, particularmente en condiciones frías, lo que muestra una calidad de las semillas más robusta. La introgresión de una secuencia polinucleotídica de acuerdo con el aspecto 5 permite obtener una calidad de las semillas de la planta menos susceptible al entorno de producción de las semillas. Esto significa que la introgresión de las secuencias polinucleotídicas de acuerdo con la presente divulgación posibilita el suministro de una calidad constante de las semillas a partir de producción convencional de semillas.

35 La introducción de las secuencias polinucleotídicas de acuerdo con la presente invención en plantas comerciales cultivadas, particularmente plantas de *Brassica* cultivadas, más particularmente plantas de *Brassica oleracea* cultivadas, garantizará una producción más fiable de semillas con suficiente calidad de las semillas. Esto aumenta significativamente la flexibilidad operativa.

40 Las semillas híbridas que comprenden cualquiera de las secuencias polinucleotídicas de acuerdo con la presente invención muestran un establecimiento de la población más uniforme, especialmente en condiciones adversas. Esto definitivamente aumentará el valor del producto comercial de semillas.

Detalles del depósito de semillas

45 Las siguientes muestras de semillas se depositaron en NCIMB, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, R.U., el 4 de abril de 2012, según las disposiciones del Tratado de Budapest en nombre de Syngenta Participations AG:
NCIMB 41950 *Brassica oleracea* A12
50 NCIMB 41951 *Brassica oleracea* SL101

Definiciones

55 A las expresiones y términos técnicos usados dentro del alcance de esta solicitud en general se les da el significado habitualmente aplicado a los mismos en la técnica relevante de ingeniería genética en plantas, mejoramiento y cultivo de plantas si no se indica lo contrario en este documento a continuación.

60 Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/o", "una" y "el/la" incluyen sus plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una planta" incluye una o más plantas y la referencia a "una célula" incluye mezclas de células, tejidos y similares.

65 Se entiende, dentro del alcance de la invención, que una "planta cultivada", particularmente "planta de *Brassica* cultivada", más particularmente "planta de *Brassica oleracea* cultivada" se refiere a una planta que ya no está en estado natural, sino que se ha desarrollado mediante cuidados humanos y para uso en seres humanos y/o con propósitos de cultivos y/o para consumo. Se entiende, además, que "planta cultivada", particularmente "planta de *Brassica* cultivada", más particularmente "planta de *Brassica oleracea* cultivada" excluyen aquellas especies de tipo

silvestre que comprenden el rasgo que es objeto de esta invención como un rasgo natural y/o parte de su genética natural.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que un "alelo" se refiere a formas alternativas o variantes de diversas unidades genéticas idénticas o asociadas con diferentes formas de un gen o de cualquier tipo de elemento genético identificable, que son alternativas en herencia porque están situadas en el mismo locus en cromosomas homólogos. Dichas formas alternativas o variantes pueden ser el resultado de polimorfismos, inserciones, inversiones, translocaciones o eliminaciones de un solo nucleótido, o la consecuencia de la regulación génica provocada, por ejemplo, por modificación química o estructural, regulación de la transcripción o modificación/regulación postraducciona. En una célula u organismo diploide, los dos alelos de un gen o elemento genético dado típicamente ocupan los locus correspondientes en un par de cromosomas homólogos.

Se entiende, dentro la presente invención, que un alelo "truncado" de un gen representa un alelo de un gen que ha perdido una sola secuencia de nucleótidos parcial o múltiples, en comparación con su alelo equivalente del gen de longitud completa.

Un alelo asociado con un rasgo cualitativo puede comprender formas alternativas o variantes de diversas unidades genéticas, incluyendo las que son idénticas o están asociadas con un solo gen o múltiples genes o sus productos, o incluso un gen alterado o controlado por un factor genético que contribuye al fenotipo representado por el locus.

Como se usa en este documento, la expresión "alelo marcador" se refiere a una forma alternativa o variante de una unidad genética como se define en este documento anteriormente, cuando se usa como un marcador para ubicar locus genéticos que contienen alelos en un cromosoma que contribuyen a la variabilidad de los rasgos fenotípicos.

Como se usa en este documento, el término "reproducción", y variantes gramaticales del mismo, se refieren a cualquier proceso que genere un individuo de la descendencia. Las reproducciones pueden ser sexuales o asexuales, o cualquier combinación de las mismas. Tipos no limitantes ejemplares de reproducción incluyen cruces, autopolinización, generación de derivados haploides duplicados y combinaciones de los mismos, que son todas técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "retrocruzamiento" se refiere a un proceso en que una descendencia híbrida se retrocruza repetidamente de nuevo con uno de los progenitores. Se pueden usar diferentes progenitores recurrentes en retrocruzamientos posteriores. Pueden producirse líneas recombinantes autopolinizando los descendientes resultantes del retrocruzamiento.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "locus" se refiere a una región en un cromosoma, que comprende un gen o cualquier otro elemento genético o factor que contribuye a un rasgo.

Se entiende, dentro del alcance de la presente invención, que "introgresión" (o sometido a introgresión) se refiere a un movimiento de uno o más genes o segmentos de ácido nucleico desde una especie a la combinación de genes de otra especie, o desde una línea a la combinación de genes de otra línea dentro de la misma especie. La introgresión puede conseguirse por cruce sexual, hibridación sexual o por transformación genética.

Como se usa en este documento, "locus marcador" se refiere a una región en un cromosoma, que comprende un nucleótido o una secuencia polinucleotídica que está presente en el genoma de un individuo y que está asociada con uno o más locus de interés, que pueden comprender un gen o cualquier otro elemento o factor genético que contribuya a un rasgo. "Locus marcador" también se refiere a una región en un cromosoma, que comprende una secuencia polinucleotídica complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico usado como sondas.

Para los fines de la presente invención, el término "segregación" o "cosegregación" se refiere al hecho de que el alelo para el rasgo y el alelo o los alelos para el marcador o los marcadores tienden a transmitirse juntos porque están físicamente muy juntos en el mismo cromosoma (recombinación reducida entre ellos a causa de su proximidad física), lo que provoca una asociación no aleatoria de sus alelos como resultado de su proximidad en el mismo cromosoma. La "cosegregación" también se refiere a la presencia de dos o más rasgos dentro de una única planta, de los que se sabe que al menos uno es genético y que no puede explicarse fácilmente por casualidad.

Como se usa en este documento, la expresión "marcador genético" o "marcador" se refiere a una característica del genoma de un individuo (por ejemplo, un nucleótido o una secuencia polinucleotídica que está presente en el genoma de un individuo) que está asociada a uno o más locus de interés. En algunas realizaciones, un marcador genético es polimórfico en una población de interés, o el locus ocupado por el polimorfismo, dependiendo del contexto. Los marcadores genéticos incluyen, por ejemplo, polimorfismos mononucleotídicos (SNP), indels (es decir, inserciones/eliminaciones), repeticiones de secuencia simple (SSR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórficos amplificados aleatoriamente (RAPD), marcadores de secuencia polimórfica amplificada y escindida (CAPS), marcadores de tecnología de matrices de diversidad (DArT) y polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), entre muchos otros ejemplos. Los marcadores genéticos pueden usarse,

por ejemplo, para localizar locus genéticos que contienen alelos en un cromosoma que contribuye a variabilidad de rasgos fenotípicos. La expresión "marcador genético" o "marcador" también puede referirse a una secuencia polinucleotídica complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico usado como sondas.

Un "marcador genético" o "marcador" puede estar físicamente localizado en una posición en un cromosoma que está dentro o fuera del locus genético con el que está asociado (es decir, es intragénico o extragénico, respectivamente). Indicado de otra manera, mientras los "marcadores genéticos" o "marcadores" típicamente se emplean cuando la ubicación en un cromosoma del gen o de una mutación funcional, por ejemplo, dentro de un elemento de control fuera de un gen que corresponde al locus de interés, no se ha identificado y hay una tasa de recombinación que no es cero entre el "marcador genético" o "marcador" y el locus de interés, la materia en cuestión divulgada en la presente también puede emplear "marcadores genéticos" o "marcadores" que están físicamente dentro de los límites de un locus genético (por ejemplo, dentro de una secuencia genómica que corresponde a un gen tal como, aunque sin limitación, un polimorfismo dentro de un intrón o un exón de un gen). En algunas realizaciones de la materia en cuestión divulgada en la presente, el uno o más "marcadores genéticos" o "marcadores" comprenden entre uno y diez marcadores, y en algunas realizaciones el uno o más marcadores genéticos comprenden más de diez marcadores genéticos.

Como se usa en este documento, el término "genotipo" se refiere a la constitución genética de una célula u organismo. El "genotipo para un conjunto de marcadores genéticos" de un individuo incluye los alelos específicos para uno o más locus marcadores genéticos, presentes en el haplotipo de un individuo. Como se sabe en la técnica, un genotipo puede estar relacionado con un único locus o con múltiples locus, pudiendo estar los locus relacionados o no relacionados y/o ligados o no ligados. En algunas realizaciones, el genotipo de un individuo se refiere a uno o más genes que están relacionados en el sentido de que uno o más de los genes están implicados en la expresión de un fenotipo de interés. Por tanto, en algunas realizaciones, un genotipo comprende un sumario de uno o más alelos presentes dentro de un individuo en uno o más locus genéticos de un rasgo cuantitativo. En algunas realizaciones, un genotipo se expresa en función de un haplotipo.

Como se usa en este documento, el término "ligamiento" y variantes gramaticales del mismo, se refiere a la tendencia de alelos en diferentes locus en el mismo cromosoma de segregar juntos más a menudo que lo que se esperaría por probabilidad si su transmisión fuera independiente, en algunas realizaciones como una consecuencia de su proximidad física.

Por ejemplo, "secuencia polinucleotídica", como se usa en este documento, se refiere a todas las formas de tipos de ácidos nucleicos y/o secuencias de nucleótidos de origen natural o generados de forma recombinante, así como a ácidos nucleicos/secuencias de nucleótidos sintetizados químicamente. Esta expresión también abarca análisis de ácido nucleico y derivados de ácido nucleico, tales como, por ejemplo, ADN bloqueado, ARN, ADNc, APN, oligonucleótidos tiofosfato y ribooligonucleótidos sustituidos. Además, la expresión "secuencia polinucleotídica" también se refiere a cualquier molécula que comprende nucleótidos o análogos nucleotídicos. La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a cualquier cadena física de unidades monoméricas que puede corresponder a una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (por ejemplo, un ADN típico, ADNc o polímero de ARN), que opcionalmente contiene bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas que tienen capacidad de incorporación en polímeros de ADN o ARN, oligonucleótidos modificados (por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden bases que no son típicas de ARN o ADN biológico, tales como oligonucleótidos 2'-O-metilados), y similares. Se entiende en este documento que el término "polinucleótido" se refiere a una molécula polimérica de alto peso molecular, que puede ser monocatenaria o bicatenaria, multicatenaria o combinaciones de las mismas, compuesta de monómeros (nucleótidos) que contienen un glúcido, fosfato y una base que es una purina o una pirimidina. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico de la materia en cuestión divulgada en la presente comprende o codifica opcionalmente secuencias complementarias, además de cualquier secuencia explícitamente indicada.

Preferiblemente, la expresión "secuencia polinucleotídica" se refiere a una molécula de ácido nucleico, es decir, ácido desoxirribonucleico (ADN) y/o ácido ribonucleico (ARN). La "secuencia polinucleotídica" en el contexto de la presente invención puede prepararse por metodología química sintética conocida por los expertos en la materia, o mediante el uso de tecnología recombinante, o puede aislarse de fuentes naturales, o mediante una combinación de los mismos. El ADN y el ARN pueden comprender opcionalmente nucleótidos no naturales y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. "Secuencia polinucleotídica" también se refiere a ADN y ARN de sentido y de antisentido, es decir, una secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia específica de nucleótidos en ADN y/o ARN. Además, la expresión "secuencia polinucleotídica" puede referirse a ADN o ARN o híbridos de los mismos o cualquier modificación de los mismos, que son conocidos en el estado de la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5525711, US 4711955, US 5792608 o EP 302175 para ejemplos de modificaciones). La secuencia polinucleotídica puede ser monocatenaria o bicatenaria, lineal o circular, natural o sintética, y sin ninguna limitación de tamaño. Por ejemplo, la secuencia polinucleotídica puede ser ADN genómico, ADNc, ARNm, ARN de antisentido, ribozima o un ADN que codifica dichos ARN o quimeroplastos (Gamper, Nucleic Acids Research, 2000, 28, 4332 – 4339). Dicha secuencia polinucleotídica puede estar en forma de un plásmido o de ADN o ARN vírico. "Secuencia polinucleotídica" también puede referirse a uno o más oligonucleótidos, en los que se incluyen cualquiera de las modificaciones del estado de la técnica tales como fosfotioatos o ácidos peptidonucleicos (APN).

Un "fragmento polinucleotídico" es una fracción de una molécula polinucleotídica dada o de una "secuencia polinucleotídica". En plantas superiores, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el material genético, mientras que el ácido ribonucleico (ARN) está implicado en la transferencia de la información contenida dentro del ADN en proteínas.

Un "genoma" es el cuerpo completo de material genético contenido en cada célula de un organismo.

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular de esta invención también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias y también la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden conseguirse generando secuencias en que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzner *et al.*, 1991; Ohtsuka *et al.*, 1985; Rossolini *et al.*, 1994). La expresión polinucleótido se usa indistintamente con ácido nucleico, secuencia de nucleótidos y pueden incluir genes, ADNc y ARNm codificados por un gen, etc.

Se entiende que el polinucleótido de la invención se proporciona en forma aislada. El término "aislado" significa que el polinucleótido divulgado y reivindicado en este documento no es un polinucleótido que se produce en su contexto natural, si acaso es que tiene un equivalente de origen natural. Por consiguiente, los otros compuestos de la invención descritos adicionalmente a continuación se entiende que están aislados. Si se reivindica en el contexto de un genoma vegetal, el polinucleótido de la invención se distingue sobre los equivalentes de origen natural por el sitio de inserción en el genoma y las secuencias flanqueantes en el sitio de inserción.

Como se usa en este documento, el término "gen" se refiere a cualquier segmento de ácido nucleico asociado con una función biológica. Por tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Por ejemplo, gen se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras. Los genes también incluyen segmentos de ADN no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Los genes pueden obtenerse de una diversidad de fuentes, incluyendo clonación desde una fuente de interés o síntesis a partir de información de secuencia conocida o predicha, y pueden incluir secuencias diseñadas para que tengan parámetros deseados.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "selección basada en marcadores" se refiere, por ejemplo, al uso de marcadores genéticos para detectar uno o más ácidos nucleicos de la planta, donde el ácido nucleico está asociado con un rasgo deseado para identificar plantas que portan genes para rasgos deseables (o indeseables), de modo que esas plantas puedan usarse (o evitarse) en un programa de mejoramiento selectivo. Un "gen marcador" codifica un rasgo de selección o cribado.

Los marcadores adecuados usados dentro de la invención pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en marcadores de polimorfismo mononucleotídico (SNP), marcadores de indel (es decir, inserciones/eliminaciones), marcadores de repetición de secuencia (SSR), marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), marcadores de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), marcadores de secuencia polimórfica ampliada y escindida (CAPS), marcadores de tecnología de matrices de diversidad (DART) y marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP).

Por ejemplo, el RFLP implica el uso de enzimas de restricción para cortar el ADN cromosómico en sitios de restricción cortos y específicos, los polimorfismos se producen por duplicaciones o eliminaciones entre los sitios o mutaciones en los sitios de restricción.

La RAPD utiliza la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de baja rigurosidad con cebadores únicos de secuencia arbitraria para generar matrices específicas de cepa de fragmentos de ADN anónimos. El método requiere solamente pequeñas muestras de ADN y analiza un gran número de locus polimórficos.

El AFLP requiere la digestión de ADN celular con una o más enzimas de restricción antes de usar la PCR y los nucleótidos selectivos en los cebadores para amplificar fragmentos específicos. Con este método, usando técnicas de electroforesis para visualizar los fragmentos obtenidos, se pueden medir hasta 100 locus polimórficos por combinación de cebador y solamente se requiere una pequeña muestra de ADN para cada uno de los ensayos.

El análisis por SSR se basa en secuencias de microsatélites de ADN (repetición corta) que están muy dispersas por todo el genoma de los eucariotas, que se amplifican de forma selectiva para detectar variaciones en repeticiones de secuencias simples. Solamente se requieren pequeñas muestras de ADN para un análisis por SSR. Los SNP usan ensayos de extensión por PCR que detectan de manera eficaz las mutaciones puntuales. El procedimiento requiere poco ADN por muestra. Uno o dos de los métodos anteriores se pueden usar en un programa típico de mejoramiento por selección basado en marcadores.

El método más preferido de conseguir amplificación de fragmentos de nucleótidos que abarcan una región polimórfica del genoma vegetal emplea la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") (Mullis *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263 273 (1986)), usando pares de cebadores que implican un cebador directo y un cebador inverso

que pueden hibridar con las secuencias proximales que definen un polimorfismo en su forma bicatenaria. Como se divulga en este documento, dichos cebadores pueden usarse para un cartografiado preciso, clonación basada en cartografiado y para análisis de expresión.

5 Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "microsatélite o marcador de SSR (repeticiones de secuencia simples)" se refiere a un tipo de marcador genético que consiste en numerosas repeticiones de secuencias cortas de bases de ADN, que se encuentran en locus por todo el genoma de la planta y tiene una probabilidad de ser altamente polimórfico.

10 Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "PCR (reacción en cadena de la polimerasa)" se refiere a un método de producción de cantidades relativamente grandes de regiones específicas de ADN o uno o más subconjuntos del genoma, haciendo posible de ese modo diversos análisis que se basan en esas regiones.

15 Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "cebador de PCR" se refiere a fragmentos relativamente cortos de ADN monocatenario usados en la amplificación por PCR de regiones específicas de ADN.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "fenotipo" se refiere a una o más características distinguibles de un rasgo genéticamente controlado.

20 Como se usa en este documento, la frase "rasgo fenotípico" se refiere a la apariencia u otra característica detectable de un individuo, que resulta de la interacción de su genoma, proteoma y/o metaboloma con el entorno.

25 Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "polimorfismo" se refiere a la presencia en una población de dos o más formas diferentes de un gen, marcador genético o rasgo hereditario o un producto génico obtenible, por ejemplo, a través de corte y empalme alternativo, metilación del ADN, etc.

30 "Sonda", como se usa en este documento, se refiere a un grupo de átomos o moléculas que puede reconocer y unirse a una molécula o estructura celular diana específica y, por tanto, permitir la detección de la molécula o estructura diana. Particularmente, "sonda" se refiere a una secuencia de ADN o ARN marcada que puede usarse para detectar la presencia de y para cuantificar una secuencia complementaria por hibridación molecular.

35 Dichas secuencias polinucleotídicas que pueden hibridar pueden identificarse y aislarse usando las secuencias polinucleotídicas descritas en este documento o partes o complementos inversos de las mismas, por ejemplo, por hibridación de acuerdo con métodos convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU.). Secuencias de nucleótidos que comprenden las mismas o sustancialmente las mismas secuencias de nucleótidos que las indicadas en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 enumeradas, o partes/fragmentos de las mismas, pueden usarse, por ejemplo, como sondas de hibridación. Los fragmentos usados como sondas de hibridación también pueden ser fragmentos sintéticos que se preparan por técnicas habituales de síntesis, cuya secuencia es sustancialmente idéntica a la de una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención.

40 El término "hibridar", como se usa en este documento, se refiere a condiciones convencionales de hibridación, preferiblemente a condiciones de hibridación en que se usa SSPE 5x, SDS al 1 %, solución de Denhardt 1x como una solución y/o las temperaturas de hibridación están entre 35 °C y 70 °C, preferiblemente 65 °C. Después de la hibridación, el lavado se realiza preferiblemente, en primer lugar, con SSC 2x, SDS al 1 % y posteriormente con SSC 0,2x a temperaturas entre 35 °C y 75 °C, particularmente entre 45 °C y 65 °C, pero especialmente a 59 °C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardt, véase Sambrook *et al. loc. cit.*). Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad, como se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al., supra*, son particularmente preferidas. Condiciones de hibridación rigurosas particularmente preferidas están presentes, por ejemplo, si la hibridación y el lavado se producen a 65 °C, como se indica anteriormente. Condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo, con hibridación y lavado realizados a 45 °C, son menos preferidas y a 35 °C incluso menos.

55 "Homología de secuencia" o "identidad de secuencia" se usa en este documento indistintamente. Los términos "idéntica" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o proteínicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una máxima correspondencia, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. Por ejemplo, este término se usa en este documento en el contexto de una secuencia de nucleótidos que tiene una homología, es decir, una identidad de secuencia, de al menos un 50 %, 55 %, 60 %, preferiblemente de al menos un 70 %, 75 %, 60 más preferiblemente de al menos un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, e incluso mucho más preferiblemente de al menos un 99 % con otra secuencia de nucleótidos, preferiblemente completa.

65 Si las dos secuencias que deben compararse entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia se refiere preferiblemente al porcentaje de los residuos nucleotídicos de la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de nucleotídicos de la secuencia más larga. Como se usa en este documento, el porcentaje de identidad/homología

entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n° de posiciones idénticas/número total de posiciones $\times$ 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada uno de los huecos, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático, como se describe a continuación en este documento. Por ejemplo, la identidad de secuencia se puede determinar convencionalmente con el uso de programas informáticos, tal como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, para encontrar el segmento con la mayor identidad de secuencia entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene, por ejemplo, una identidad de un 95 % con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferiblemente de modo que el porcentaje de identidad se calcule en toda la longitud de la secuencia de referencia y que se permitan brechas de homología de hasta un 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los denominados parámetros opcionales se dejan preferiblemente en sus valores predeterminados ("por defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias de la invención descritas anteriormente pueden estar provocadas, por ejemplo, por adición, eliminación, sustitución, inserción o recombinación. Dicha comparación de secuencias también se puede realizar preferiblemente con el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, septiembre de 1998 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ejemplos adjuntos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Para este fin, pueden usarse los ajustes de parámetros "por defecto".

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. La frase: "hibridación específicamente con" se refiere a la unión, duplicación o hibridación de una molécula solamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de ADN o ARN (por ejemplo, celular total). "Se une(n) sustancialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico sonda y un ácido nucleico diana y abarca desajustes menores que pueden acomodarse reduciendo la rigurosidad de los medios de hibridación para lograr la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

Las "condiciones de hibridación rigurosas" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas", en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tales como las hibridaciones de Southern y Northern, dependen de la secuencia y son diferentes para parámetros ambientales distintos. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* parte I capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, Nueva York. En general, las condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Típicamente, en "condiciones rigurosas" hibridará una sonda con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias.

El punto de fusión térmico es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la temperatura de fusión (T_m) para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios en un filtro en una transferencia de Southern o Northern son formamida al 50 % con 1 mg de heparina a 42 °C, realizándose la hibridación durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es NaCl 0,15 M a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado con SSC 0,2x a 65 °C durante 15 minutos (véase, Sambrook, *infra*, para una descripción del tampón SSC). A menudo, un lavado de rigurosidad alta va precedido por un lavado de rigurosidad baja para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un ejemplo de lavado de rigurosidad media para una estructura bicatenaria de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 1x a 45 °C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de rigurosidad baja para una estructura bicatenaria de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 4-6x a 40 °C durante 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas implican típicamente concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1,0 M de ion Na, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ion Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente de al menos aproximadamente 30 °C. También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2 veces (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético.

Una "planta" es cualquier planta en cualquier estado de desarrollo, particularmente una planta de semilla.

Una "parte de la planta", como se usa en este documento, se refiere a subunidades estructurales y/o funcionales de una planta incluyendo, aunque sin limitación, células vegetal, tejidos vegetales, material vegetal, órganos vegetales, partes recolectables de la planta, etc., como se define a continuación en este documento.

5 Una "parte recolectable de la planta" es una parte de una planta que se refiere a esas partes de la planta que se recolectan en cualquier momento adecuado y pueden procesarse además para uso industrial o consumo, incluyendo flores, frutos, hojas, semillas, fibras, etc.

10 Una "célula vegetal" es una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una única célula aislada o de una célula cultivada, o como parte de una unidad con una organización superior tal como, por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta entera.

15 El "cultivo de células vegetales" significa cultivos de unidades vegetales tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo celular, células en tejidos vegetales, polen, tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diferentes estados de desarrollo.

20 "Material vegetal" o "material vegetal que se obtiene de una planta" se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, cultivos celulares o de tejidos, o cualquier otra parte o producto de una planta.

Un "órgano de una planta" es una parte distinta y visiblemente estructurada y diferenciada de una planta, tal como una raíz, un tallo, una hoja, una yema floral o un embrión.

25 "Tejido vegetal", como se usa en este documento, se refiere a un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional. Se incluye cualquier tejido de una planta en la planta o en cultivo. Esta expresión incluye, aunque sin limitación, plantas enteras, órganos vegetales, semillas de plantas, cultivo tisular y cualquier grupo de células vegetales organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. El uso de esta expresión junto con, o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido vegetal, como los enumerados anteriormente o que esté contemplado de otra manera por esta definición, no pretende ser exclusivo de ningún otro tipo de tejido vegetal.

Como se usa en este documento, el término "población" significa un conjunto genéticamente heterogéneo de plantas que comparten una derivación genética común.

35 Como se usa en este documento, el término "variedad" o "cultivar" significa un grupo de plantas similares que, por sus características estructurales y su rendimiento, pueden identificarse a partir de otras variedades dentro de la misma especie.

40 Como se usa en este documento, la expresión "técnicas de transformación de plantas" se refiere a la introducción de un transgén, que confiere un rasgo específico, en la planta hospedadora. El transgén se incorpora en el genoma de la planta hospedadora y se hereda de forma estable a través de futuras generaciones. Se añaden las secuencias reguladoras correctas al gen de interés, es decir, promotores y terminadores, después el ADN se transfiere al cultivo de células vegetales usando un vector apropiado. En algunas realizaciones, el gen se fija a un marcador de selección que permite la selección por la presencia del transgén como se describe en este documento anteriormente. Una vez se ha transformado el tejido vegetal, las células que contienen el transgén se seleccionan y se realiza la regeneración de nuevo en plantas completas.

50 La transformación de las plantas puede realizarse de varias maneras diferentes para generar hospedadores vegetales con funciones delegadas requeridas que hacen que el hospedador vegetal sea competente para la expresión de la secuencia de interés, dependiendo de la especie de la planta en cuestión. Por ejemplo, puede usarse transformación mediada por *Agrobacterium* para transformar plantas de acuerdo con la invención. Dentro de este método de transformación, se corta la planta o el tejido vegetal (por ejemplo, hojas) en pequeños trozos, por ejemplo, de 10 x 10 mm, y se remojan durante 10 minutos en un líquido que contiene *Agrobacterium* suspendida que contiene un vector de plásmido Ti portado por *Agrobacterium* (documentos US 5591616; US 4940838; US 5464763). Colocadas en un medio de enraizamiento y despunte de selección, las plantas volverán a crecer.

60 Las técnicas que no se basan en *Agrobacterium* implican la captación de material genético exógeno directamente por los protoplastos o las células. Estas técnicas incluyen, aunque sin limitación, captación mediada por PEG o electroporación, suministro mediado por bombardeo de partículas y microinyección. Ejemplos de estas técnicas se describen en Paszkowski *et al.*, EMBO J 3, 2717-2722 (1984), Potrykus *et al.*, Mol. Gen. Genet. 199,169-177 (1985), Reich *et al.*, Biotechnology 4:1001-1004 (1986) y Klein *et al.*, Nature 327,70-73 (1987). En cada caso, las células transformadas se regeneran en plantas completas usando técnicas convencionales. Por ejemplo, en el bombardeo de partículas, se recubren partículas de oro o tungsteno con ADN y después se disparan en células vegetales jóvenes o embriones vegetales (documentos US 05100792; EP 00444882B1; EP 00434616B1). Algo de material genético quedará en las células y las transformará. Este método también puede usarse para transformar plástidos vegetales. Además, puede usarse la técnica de electroporación para transformar plantas de acuerdo con la invención. Durante

la electroporación, se preparan orificios transitorios en las membranas celulares usando choque eléctrico que permite que el ADN entre en la célula. Otra técnica de transformación dentro de la invención puede ser transformación vírica (transducción). Aquí, el material genético deseado se empaqueta en un virus de plantas adecuado y se permite que este virus modificado infecte la planta. Si el material genético es ADN, puede recombinarse con los cromosomas para producir células transformadas. Sin embargo, los genomas de la mayoría de virus de plantas consisten en ARN monocatenario que se replica en el citoplasma de la célula infectada.

La transformación o genomanipulación de la planta o célula vegetal con una secuencia de nucleótidos o el vector de acuerdo con la invención puede realizarse por métodos convencionales, como se describe, por ejemplo, en Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. Además, la célula vegetal transgénica de la presente invención se cultiva en medio nutritivo que cumple los requisitos de la célula particular usada, en particular con respecto al valor de pH, la temperatura, la concentración salina, la aireación, los antibióticos, las vitaminas, los oligoelementos, etc.

La expresión "vector" o "molécula de vector", como se usa en este documento, puede comprender un casete de expresión que puede comprender secuencias de control de la expresión unidas de forma funcional a dicho polinucleótido. El vector o vectores pueden estar en forma de un plásmido, y pueden usarse en solitario o en combinación con otros plásmidos, para proporcionar plantas transformadas, usando métodos de transformación como se describe a continuación para incorporar transgenes en el material genético de la planta o las plantas. Vectores adicionales pueden comprender cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores habitualmente usados en ingeniería genética.

Un "transgén" se refiere a un gen que se ha introducido en el genoma por transformación y se mantiene de forma estable. Los transgenes pueden incluir, por ejemplo, genes que son heterólogos u homólogos a los genes de una planta particular a transformar. Además, los transgenes pueden comprender genes naturales insertados en un organismo no natural, o genes quiméricos.

"Secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ADN o ARN que codifica una secuencia de aminoácidos específica y excluye las secuencias no codificantes. Puede constituir una "secuencia codificante ininterrumpida", es decir, que carece de un intrón, tal como en un ADNc o puede incluir uno o más intrones unidos mediante uniones de corte y empalme apropiadas. Un "intrón" es una secuencia de ARN que está contenida en el transcrito primario, pero que se retira a través de escisión y religamiento del ARN dentro de la célula para crear el ARNm maduro que puede traducirse en una proteína.

La expresión "casete de expresión", como se usa en este documento, puede estar compuesto de una o más secuencias de nucleótidos de la presente invención en unión funcional con secuencias de nucleótidos reguladoras que controlan su expresión. Como se sabe en la técnica, un casete de expresión puede consistir en una secuencia promotora (promotor), un marco abierto de lectura o una parte funcional del mismo, una región no traducida 3' y una secuencia terminadora (terminador). El casete puede ser parte de una molécula de vector como se describe en este documento anteriormente. Diferentes casetes de expresión pueden transformarse en plantas o células vegetales siempre que se usen las secuencias reguladoras correctas.

Como se usa en este documento, el término "promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos, habitualmente anterior (5') a su secuencia codificante, que controla la expresión de la secuencia codificante proporcionando el reconocimiento para la ARN-polimerasa y otros factores necesarios para una transcripción apropiada. Un "promotor" incluye un promotor mínimo que es una secuencia corta de ADN compuesta de un dominio TATA y otras secuencias que sirven para especificar el sitio de inicio de la transcripción, al que se añaden elementos reguladores para el control de la expresión. Además, un "promotor" también se refiere a una secuencia de nucleótidos que incluye un promotor mínimo más elementos reguladores, que puede controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. Este tipo de secuencia promotora consiste en elementos anteriores proximales y más distales, denominándose los últimos elementos a menudo potenciadores. Por consiguiente, un "potenciador" es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad promotora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad de tejido de un promotor. Puede funcionar en ambas orientaciones (normal o invertido), y puede funcionar incluso cuando se mueve en dirección 5' o 3' desde el promotor. Tanto los potenciadores como otros elementos promotores en dirección 5' se unen a proteínas de unión a ADN específicas de secuencia que median sus efectos. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen natural, o pueden estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso pueden comprender segmentos de ADN sintético. Un promotor también puede contener secuencias de ADN que están implicadas en la unión de factores proteínicos que controlan la eficacia del inicio de la transcripción en respuesta a condiciones fisiológicas o del desarrollo.

El "sitio de inicio" es la posición que rodea el primer nucleótido que es parte de la secuencia transcrita, que también se define como la posición +1. Con respecto a este sitio, se numeran todas las demás secuencias del gen y sus regiones de control. Las secuencias posteriores (es decir, secuencias adicionales que codifican proteína en la dirección 3') se denominan positivas, mientras que las secuencias anteriores (principalmente las regiones de control en la dirección 5') se denominan negativas.

Los elementos promotores, particularmente un elemento TATA, que son inactivos o que tienen actividad promotora enormemente reducida en ausencia de activación en dirección 5' se denominan "promotores mínimos o centrales". En presencia de un factor de transcripción adecuado, el promotor mínimo funciona permitiendo la transcripción. Un "promotor mínimo o central", por tanto, consiste únicamente en todos los elementos básicos necesarios para el inicio de la transcripción, por ejemplo, un dominio TATA y/o un iniciador.

De acuerdo con la invención, el término "promotor" es una región reguladora de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que dirige la transcripción de un gen. Los promotores están ubicados típicamente cerca de los genes que regulan, en la misma hebra y anteriores (hacia la región 5' de la hebra de sentido). Varios tipos de promotores son bien conocidos en las técnicas de transformación, así como otros elementos reguladores que pueden usarse en solitario o en combinación con otros promotores. Un "promotor vegetal" es un promotor que puede iniciar la transcripción en células vegetales. Ejemplos de promotores bajo control por el desarrollo incluyen "promotores específicos de tejidos" que se refieren a promotores regulados que no se expresan en todas las células vegetales, sino solamente en uno o más tipos celulares en órganos específicos (tal como hojas o semillas), tejidos específicos (tal como embrión o cotiledón), o tipos celulares específicos (tal como parénquima de las hojas o células de almacenamiento de las semillas). Estos también incluyen promotores que se regulan temporalmente, tal como en embriogénesis temprana o tardía, durante la maduración de los frutos en semillas o frutos en desarrollo, en hojas completamente diferenciadas, o en el inicio de la senescencia.

Un promotor específico de "tipo celular" o también llamado "promotor inducible" principalmente dirige la expresión en determinados tipos celulares en uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares en raíces u hojas mediante un estímulo externo, tal como un agente químico, luz, hormona, agresión o un patógeno.

"Expresión constitutiva" se refiere a la expresión usando un promotor constitutivo o regulado. "Expresión regulada" o "condicionada" se refiere a la expresión controlada por un promotor regulado.

"Promotor constitutivo" se refiere a un promotor que puede expresar el marco abierto de lectura (ORF) que predomina en todos o casi todos los tejidos vegetales durante todos o casi todos los estados de desarrollo de la planta. Cada uno de los elementos activadores de la transcripción no muestra una especificidad de tejido absoluta, sino que media la activación transcripcional en la mayoría de partes de la planta a un nivel de ≥ 1 % del nivel alcanzado en la parte de la planta en que la transcripción es más activa.

"Promotor regulado" se refiere a promotores que no dirigen la expresión génica de forma constitutiva, sino de un modo regulado temporal y/o espacialmente, e incluyen tanto promotores específicos de tejido como inducibles. Incluye secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en diferentes estados de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Constantemente se están descubriendo nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales, numerosos ejemplos pueden encontrarse en la compilación de Okamoto *et al.* (1989). Los promotores regulados típicos útiles en plantas incluyen, aunque sin limitación, promotores inducibles por protectores, promotores derivados del sistema inducible por tetraciclina, promotores derivados de sistemas inducibles por salicilato, promotores derivados de sistemas inducibles por alcohol, promotores derivados del sistema inducible por glucocorticoesteroides, promotores derivados de sistemas inducibles por patógenos y promotores derivados de sistemas inducibles por ecdisona.

"Unido de forma funcional" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico de modo que la función de uno se vea afectada por el otro. Por ejemplo, una secuencia de ADN reguladora se dice que está "unida de forma funcional a" o "asociada con" una secuencia de ADN que codifica un ARN o un polipéptido si las dos secuencias están situadas de modo que la secuencia de ADN reguladora afecta a la expresión de la secuencia de ADN codificante (es decir, que la secuencia codificante o ARN funcional está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse de forma funcional a secuencias reguladoras en orientación de sentido o de antisentido.

En el contexto anterior, el término "terminador" se refiere a una región reguladora de una secuencia de ADN que marca el final de un gen en ADN genómico para la transcripción y, por tanto, inicia la terminación de la transcripción del gen respectivo.

"Expresión", como se usa en este documento, se refiere a la transcripción y/o traducción de un gen endógeno, ORF o parte del mismo, o un transgén en plantas. Por ejemplo, en el caso de construcciones de antisentido, la expresión puede referirse a la transcripción del ADN de antisentido solamente. Además, expresión se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN de sentido (ARNm) o funcional. Expresión también puede referirse a la producción de proteína.

"Sobreexpresión" se refiere al nivel de expresión en células u organismos transgénicos que excede los niveles de expresión en células u organismos normales o no transformados (no transgénicos).

"Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de ARN de antisentido que pueden suprimir la expresión de la proteína desde un gen endógeno o un transgén.

"Silenciamiento génico" se refiere a supresión dependiente de homología de genes víricos, transgenes o genes nucleares endógenos. El silenciamiento génico puede ser transcripcional, cuando la supresión se debe a transcripción disminuida de los genes afectados, o postranscripcional, cuando la supresión se debe a recambio (degradación) aumentado de especies de ARN homólogas a los genes afectados (English *et al.*, 1996). El silenciamiento génico incluye silenciamiento génico inducido por virus (Ruiz *et al.*, 1998).

Como se usa en este documento, el término "BAC" significa cromosoma artificial bacteriano y define una construcción de ADN, basada en un plásmido de fertilidad funcional usado para transformación y clonación en bacterias, tales como *E. coli*. Los BAC pueden usarse para secuenciar el genoma de organismos tales como plantas. Un corto trozo del ADN del organismo se amplifica como un inserto en BAC, y después se secuencia. Finalmente, las partes secuenciadas se reordenan *in silico*, produciendo la secuencia genómica del organismo.

Como se usa en este documento, "vigor aumentado de las semillas" se refiere a la capacidad de una semilla de germinar rápidamente, de una manera uniforme, y de conseguir un alto porcentaje de germinación; de producir plántulas que brotan rápidamente del suelo y tienen un alto porcentaje de brote; de producir plántulas que crecen rápidamente y demuestran tolerancia superior a diversas agresiones incluyendo, aunque sin limitación, frío. El vigor de las semillas es la cuantificación de cualquiera de los parámetros mencionados anteriormente y cualquier combinación de estos.

"Germinación de las semillas" se define como el brote de la radícula desde el tegumento.

"Velocidad de germinación", a partir de ahora en este documento, se refiere al promedio de tiempo observado entre la imbibición de la semilla y el brote de la radícula desde el tegumento.

A lo largo de la aplicación, la velocidad de germinación puede medirse finalmente calculando el periodo de tiempo que se necesita para observar un 50 % de germinación de las semillas (resultados expresados como una medición T50).

Debe entenderse "velocidad aumentada de germinación" como una diferencia observable significativa entre la germinación de la semilla que comprende un polinucleótido de acuerdo con la realización 5 frente a una semilla que no comprende uno de dichos polinucleótidos. Típicamente, una velocidad aumentada de germinación significa que la semilla que comprende un polinucleótido de acuerdo con la realización 5 germina antes que una semilla que no comprende la SEQ ID NO 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

Debe entenderse "velocidad modificada de germinación" como una diferencia observable significativa entre la germinación de la semilla que comprende un polinucleótido de acuerdo con las realizaciones 1 a 7 frente a una semilla que no comprende uno de dichos polinucleótidos. Típicamente, una velocidad modificada de germinación significa que la semilla que comprende un polinucleótido de acuerdo con las realizaciones 1 a 7 germina de forma diferente a la semilla que no comprende la SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Como se usa en este documento, la uniformidad de la germinación de las semillas puede expresarse como el tiempo entre un 10 % de germinación y un 90 % de germinación. Cuanto más corto sea este periodo, mejor será la uniformidad de la germinación de las semillas.

Las "condiciones ambientales externas adversas" son condiciones que inhiben o posponen la germinación de la semilla o el brote de la plántula. En el contexto de la presente invención, el frío es un factor, entre otros, que puede considerarse adverso respecto a las condiciones de germinación normales.

Se entiende que "brote (de una plántula)" se refiere al crecimiento de la planta que es observable.

Debe entenderse "brote aumentado de plántulas" como una diferencia observable significativa entre el brote de una plántula desde una semilla que comprende un polinucleótido de acuerdo con la realización 5 frente a una semilla que no comprende la SEQ ID NO 3, 4 o 6.

La invención será más evidente a partir de los siguientes ejemplos no limitantes junto con la lista de secuencias que se describe a continuación:

SEQ ID NO 1: Secuencia polinucleotídica correspondiente al alelo A12DHd del gen *BolC.VG1.a* (ortólogo de *Brassica oleracea* del gen *At3g01060*).

SEQ ID NO 2: Secuencia polinucleotídica correspondiente al alelo A12DHd del gen *BolC.VG2.a* (ortólogo de *Brassica oleracea* del gen *At3g01150*).

SEQ ID NO 3: Secuencia polinucleotídica correspondiente al alelo GD33DHd del gen *BolC.VG1.a* (ortólogo de *Brassica oleracea* del gen *At3g01060*).

SEQ ID NO 4: Secuencia polinucleotídica correspondiente al alelo GD33DHd del gen *Bo/C.VG2.a* (ortólogo de *Brassica oleracea* del gen *At3g01150*).

SEQ ID NO 5: Secuencia polinucleotídica correspondiente al alelo A12DHd truncado del gen *Bo/C.VG2.b* (ortólogo de *Brassica oleracea* del gen *At3g01150*).

- 5 SEQ ID NO 6: Secuencia polinucleotídica correspondiente al alelo GD33DHd truncado del gen *Bo/C.VG2.b* (ortólogo de *Brassica oleracea* del gen *At3g01150*).

Breve descripción de las figuras

- 10 La figura 1 es una representación gráfica de las curvas de germinación acumulativa de semillas de la línea de sustitución SL101 (○) y líneas progenitoras (A12DHd (■) y GDDH33 (●)) a 15 °C en agua. Las líneas verticales son los errores típicos.

- 15 La figura 2 es una representación gráfica de las curvas de germinación acumulativa de SL101 (◇) y el progenitor recurrente A12DHd (■) y líneas de retrocruzamiento F₁ recíprocas (A12DHd x SL101 (p) y SL101 x A12DHd (○)). Las líneas verticales son los errores típicos.

- 20 La figura 3 es una representación gráfica del brote de plántulas acumulativo en el terreno a partir de semillas de la línea de sustitución SL101 (▲) y líneas progenitoras A12DHd (●) y GDD33H (■).

- La figura 4 es un diagrama que ilustra las concentraciones endógenas de ABA durante la germinación en semillas de la línea de sustitución SL101 (columna blanca) y líneas progenitoras, GDDH33 (columna negra) y A12DHd (columna gris).

- 25 La figura 5 es un diagrama que ilustra la velocidad de germinación de las semillas en 3, para el gen *At3g01060* (columnas negras), y 2, para el gen *At3g01150* (columnas grises), líneas KO. La línea de control de tipo silvestre (columna blanca) es col0.

- 30 La figura 6 es un diagrama que ilustra la velocidad de germinación de las semillas en líneas KO 102 (línea gris claro) y 18 (línea gris medio bajo) (para el gen *At3g01060*) y en líneas KO 15 (líneas gris medio alto) y 3 (línea gris oscuro) (para el gen *Atg01150*) en comparación con la línea de control de tipo silvestre Col0 (línea negra), después de la producción de semillas en el invernadero (condiciones más agresivas).

Ejemplo 1

- 35 Material y métodos

Producción de semillas y comparación de líneas

- 40 Se obtuvieron muestras de semillas de la Universidad de Birmingham, R.U., para una serie de líneas de sustitución cromosómica de *Brassica oleracea* derivadas de las líneas progenitoras doble haploides A12DHd (var. *alboglabra*) y GDDH33 (var. *italica*; Rae *et al.*, 1999). Entonces se produjeron semillas en masa y se recogieron de 10 plantas replicadas individuales de las líneas de sustitución y el progenitor GDDH33 y 20 plantas del progenitor recurrente A12DHd como líneas de sustitución se comparan con la última en experimentos de germinación. Las plantas se disponen en un bloque aleatorizado con 10 réplica en un invernadero a 16-18 °C durante las 16 h del día y a 10-15 °C en la noche, como se describe por Bettey *et al.* (2000). Se aportaba iluminación complementaria (lámparas de sodio de alta presión de 400 W; Osram Ltd, St Helens, R.U.) cuando la intensidad de la luz caía por debajo de 300 w m² durante las 16 h del día. Las plantas se autopolinizaron encerrando las inflorescencias en bolsas de polietileno perforadas que contenían moscardones antes de que las flores se abrieran. Se permitió que las vainas de la semilla se secaran completamente sobre la planta dentro de las bolsas circundantes antes de la recolección. Las semillas se limpiaron, se equilibraron a un 15 % de HR y 15 °C, y después se almacenaron a -20 °C antes de que se realizaran los experimentos de germinación. La germinación acumulativa en papel de filtro húmedo se registró a 15 °C en 4 réplicas de 15 semillas recogidas de cada una de las 10 plantas replicadas (o 20, A12DHd) descritas anteriormente. Trabajos previos habían demostrado que estas son suficientes semillas (Bettey *et al.*, 2000). Se hicieron recuentos frecuentes para permitir un cálculo preciso del tiempo hasta un 50 % de germinación a partir de estas mediciones. El porcentaje de germinación fue elevado en todos los lotes de semillas.

- 60 En los últimos experimentos, se produjeron semillas F₁ de retrocruzamientos recíprocos de la misma manera que se describe anteriormente. La polinización de yemas se realizó para hacer el cruce que produce F₁. Las semillas de las líneas progenitoras se produjeron al mismo tiempo para hacer comparaciones para minimizar la influencia de las diferencias ambientales durante la producción de semillas. Además, en varias ocasiones en diferentes momentos del año, se produjeron semillas de plantas replicadas tanto del progenitor A12DHd como de la línea de sustitución SL101

en invernaderos como se describe anteriormente. Aunque los ajustes de calentamiento, ventilación e iluminación del invernadero permanecieron igual que los descritos anteriormente, la temperatura ambiente difería y se registró.

Ensayos de germinación

Tres réplicas biológicas de 50 semillas de líneas de *Brassica oleracea* de sustitución y progenitoras o de 3 a 15 réplicas biológicas de 50 semillas de líneas de tipo silvestre y mutantes de *Arabidopsis* se colocaron para que germinaran en 2 capas de papel de filtro (Whatman International Ltd., R.U.) que mantuvieron húmedas durante todo el tratamiento con agua.

En todos los experimentos de germinación, las semillas en el papel de filtro se mantuvieron en cajas de poliestireno transparentes dispuestas en bloques aleatorizados y se mantuvieron en la oscuridad. No se observaron evidencias de infección fúngica y, por tanto, las semillas no se esterilizaron para evitar influir en su germinación. La germinación (brote de la radícula) se registró a intervalos para construir curvas de germinación acumulativa.

Brote en el terreno

Como parte de una comparación no publicada más grande del brote de plántulas a partir de genotipos de *B. oleracea*, se sembraron 100 semillas de las líneas progenitoras GDDH33, A12DHd y la línea de sustitución SL101 el 31 de mayo, en 4 filas de 1 m replicadas dispuestas en un bloque aleatorizado. Las semillas se sembraron a mano en un surco de 15 mm de profundidad, se cubrieron con suelo tamizado (tamaño de orificio del tamiz < 4 mm) y a la superficie se le pasó rodillo una vez con una rueda de prensa taladradora de semillas Stanhay. El suelo era un suelo franco arenoso y se aplicó irrigación para mantener la humedad del suelo durante toda la germinación de las semillas y el brote de plántulas. Lo último se registró a intervalos regulares hasta que no brotaron más plántulas.

Análisis de hormonas

Se tomaron muestras de semillas de líneas de sustitución y progenitoras como semillas secas no embebidas y semillas embebidas durante 24 y 48 horas a 15 °C en papel de filtro húmedo. Cada muestra contenía 1 g de semillas secas medido antes de la imbibición. Las muestras se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido, se liofilizaron y después se colocaron en un congelador doméstico a -20 °C hasta la extracción. Las muestras estaban en 10 ml de metanol al 80 % (que contenía 20 mg l-l de BHT) frío (4 °C), después se añadieron 500 ng de ABA y 100 ng de cada uno de los patrones de GA. Las muestras se agitaron durante una noche en una vitrina fría y después se centrifugaron. El sobrenadante se decantó y el sedimento se resuspendió en 10 ml adicionales de metanol al 80 %. Las muestras se agitaron durante 4 h, se centrifugaron y los sobrenadantes se combinaron. Los sobrenadantes se evaporaron a acuosidad (aprox. 3-4 ml) y se añadieron 10 ml de tampón fosfato 0,5 M pH 8,2, las muestras se repartieron con 2 x 15 ml de diclorometano, y el diclorometano se descartó. La fracción acuosa se ajustó hasta pH 3 con ácido fosfórico 1 M repartido con 3 x 15 ml de acetato de etilo.

Las fracciones de acetato de etilo combinadas se lavaron con 2 x 3,5 ml de agua pH 3,0 y se evaporaron a sequedad, se volvieron a disolver en 5 ml de agua y el pH se ajustó hasta 8. La solución entonces se cargó en cartuchos QMA que se lavaron posteriormente con 5 ml de metanol al 15 % pH 8,0. Los GA y ABA se eluyeron de los cartuchos QMA directamente en cartuchos C18 21 con ácido fórmico 0,2 M en metanol al 5 %. Los cartuchos C18 entonces se lavaron con 5 ml de metanol al 20 % y las muestras se recuperaron en 5 ml de metanol al 80 % y se evaporaron a sequedad. Las muestras entonces se disolvieron en metanol y se metilaron con exceso de diazometano etéreo. Después de la evaporación a sequedad, las muestras se volvieron a disolver en acetato de etilo seco y se pasaron a través de cartuchos de amino. Las muestras resultantes se analizaron directamente para el contenido de ABA mediante CG-EM, después se evaporaron a sequedad y se volvieron a disolver en BSTFA antes del análisis para el contenido de GA por CG-EM.

Análisis de marcadores

Se diseñaron pares de cebadores para 30 modelos de genes de *Arabidopsis* que se propagaron a intervalos por la región *SOG1* usando el programa informático Primer 3 (http://gene.pbi.nrc.ca/cgibin/primer/primer3_www.cgi) y los datos de genes de Tair (<http://www.arabidopsis.org/>) para dar productos de PCR de 200 a 700 pb. La mezcla de PCR usada era convencional, pero se usó un programa de rampa descendente. Esta consistía en los parámetros de ciclado siguientes: 94 °C durante 5 min; después hibridación a 65 °C hasta 55 °C durante 10 ciclos bajando un grado en cada ciclo con 30 s de extensión a 72 °C y 30 s de desnaturalización a 94 °C durante los 10 ciclos; seguidos de 30 ciclos de 94 °C de 30 s, 55 °C de 30 s, 72 °C de 45 s; y una extensión final a 72 °C durante 15 min. Las secuencias de los cebadores para los modelos de genes que dieron resultados polimórficos se seleccionaron como marcadores (tabla 1).

Análisis de los datos

Todos los análisis se realizaron usando el paquete estadístico Genstat 5 (Payne *et al.* 1993), y cuando era apropiado, los datos se sometieron a análisis de la varianza.

Resultados

El QTL para la velocidad de germinación (SOG1) en el grupo de ligamiento C1 se confirmó y se cartografió de forma precisa

El análisis de la varianza de los datos de germinación que compara las líneas de sustitución y progenitoras mostró que el progenitor GDDH33 germinaba significativamente ($P < 0,001$) más rápido que el progenitor A12Dhd, lo que confirma que los alelos positivos de la velocidad de germinación se proporcionan por GDDH33, como se muestra por Bettey *et al.* (2000) (figura 1). Había 4 líneas de sustitución que abarcaban el QTL SOG1 (SL101, SL111, SL118, SL119) y todas estas tenían una germinación significativamente ($P < 0,005$) más rápida que el progenitor A12Dhd. La línea de sustitución SL101 tenía la región de introgresión más pequeña (1-9 cM; Rae *et al.*, 1999) que potenciaba la velocidad de germinación en comparación con A12Dhd y explicaba gran parte de la diferencia en la velocidad de germinación entre las líneas progenitoras (figura 1) y, por lo tanto, se seleccionó para estudio adicional de SOG1.

El fenotipo de germinación rápida SOG1 no se ve influido por el genotipo materno

La velocidad de germinación se determina por el embrión, pero también puede verse influido significativamente por los tejidos que lo rodean que son de origen materno. Se realizaron retrocruzamientos recíprocos entre SL101 y A12Dhd y entre GDDH33 y A12Dhd para determinar los componentes genéticos maternos y cigóticos en el locus SOG1. La germinación se registró a partir de las semillas F1 de cada cruce y a partir de las semillas de las líneas progenitoras autopolinizadas producidas al mismo tiempo. No hubo diferencias significativas en la velocidad de germinación de SL101 y la F1 de los retrocruzamientos recíprocos con A12Dhd (SL101 como planta madre y polen de A12Dhd y viceversa), pero la germinación de las semillas de las tres fue significativamente ($P < 0,01$) más rápida que la de semillas de A12Dhd (figura 2). Esto muestra que el alelo GDDH33 de germinación más rápida es dominante sin influencia materna genética sobre la herencia del rasgo, que confirma que se basa en el embrión.

Diferencias en la velocidad de germinación da lugar a diferencias en la cronología del brote de plántulas en el terreno

Los datos anteriores muestran que la velocidad de germinación de semillas GDDH33 y SL101 era significativamente mayor que la de A12Dhd en condiciones de temperatura constante. En el terreno esto provocó brote de plántulas significativamente más pronto de GDDH33 y SL101 que de A12Dhd (figura 3).

La concentración de ABA endógeno difiere entre genotipos en la madurez

La concentración endógena de ABA en semillas secas y de imbibición de los tres genotipos se midió usando CGEM. No hubo diferencias significativas en la concentración endógena de ABA en la semilla seca de SL101 y GD33 o durante la imbibición hasta 48 horas justo antes del brote de la radícula. La concentración de ABA en estos dos lotes de semillas permaneció igual durante las primeras 24 horas y después disminuyó hasta la mitad en 48 horas. Por el contrario, la concentración endógena de ABA en semillas de A12Dhd inicialmente fue tres veces mayor que en SL101 y GDDH33 y después disminuyó progresivamente durante el periodo de 48 horas de imbibición, pero permaneció significativamente por encima de la de los otros dos lotes de semillas (figura 4). De forma interesante, si ABA sigue disminuyendo a la misma velocidad en A12Dhd alcanzaría el mismo nivel después de 72 horas, el punto de germinación, que se observa en las otras dos líneas inmediatamente antes de su germinación.

Los resultados para las líneas GDDH33, SL101 y A12Dhd presentados aquí muestran una clara relación determinada genéticamente entre el mayor contenido de ABA endógeno y la menor velocidad de germinación y viceversa.

Se ha realizado un análisis genético cuantitativo del rasgo de velocidad de germinación en Brassica oleracea.

Mediante cartografiado preciso del QTL con la línea de sustitución descrita previamente SL101, finalmente se identificaron dos genes subyacentes del QTL (*Speed Of Germination (SOG1)* - velocidad de germinación). Este línea SL101 tiene una corta introgresión en el extremo telomérico de C1 del progenitor de terminación rápida (GD33, brécol) en el fondo del progenitor de germinación lenta (A12, col rizada) en *Brassica oleracea*. Usando marcadores en toda esta región de introgresión de SL101, se identificaron 30 recombinaciones a lo largo de esta zona dentro de 1300 líneas, gracias a una estrategia de solapamiento de BAC. Esta estrategia permite reunir la líneas en 5 grupos distintos y las 2 líneas progenitoras. Entonces se evaluó la germinación de las semillas en la totalidad de estos 7 grupos y el análisis estadístico reveló que la germinación más rápida estaba asociada con 2 marcadores en el extremo telomérico de C1. La colocalización de estos marcadores con un solo BAC en el extremo telomérico de C1 se evaluó adicionalmente por hibridación de fluorescencia *in situ* (Fluorescence In-Situ Hybridization - FISH). El BAC se secuenció y se encontraron 12 genes de longitud completa presentes dentro del mismo.

Se han identificado supuestos ortólogos de estos genes de *Brassica* en *Arabidopsis*, en el brazo superior del cromosoma 3, donde se ha localizado un QTL SOG1 (Clerkx *et al.* 2004). Basándonos en la buena colinealidad genética entre el extremo telomérico de C1 en *Brassica oleracea* y el brazo superior del cromosoma 3 en *Arabidopsis* (véase anteriormente y a continuación), es razonable creer que los genes que se identificaron en *Brassica* y en

Arabidopsis comparten una función común en la germinación de las semillas. Para reforzar nuestra hipótesis, hemos identificado líneas mutantes de inactivación (KO) de *Arabidopsis* en supuestos genes ortólogos de los que se han descubierto en *Brassica*. Se descubrió que dos de estas líneas KO tenían un fenotipo de germinación significativo (germinación más rápida en comparación con la línea de control Col0), lo que sugiere que estos genes actúan como reguladores negativos de la germinación (figura 5). Es interesante observar que al menos dos líneas KO diferentes se usaron para evaluar el fenotipo de germinación y que estas distintas líneas KO mostraron resultados similares con respecto a la velocidad de germinación. Cuando se evalúan después de la producción de las semillas en condiciones más agresivas (figura 6), los resultados son muy comparables.

Este estudio funcional, por tanto, ha confirmado la función de los genes *Atg01060* y *Atg01150* en la regulación del vigor de las semillas, en particular en la regulación de la velocidad de germinación. Los ortólogos de *Brassica* de estos genes, *BoIC.VG1.a* y *BoIC.VG1.b*, que se han identificado dentro del QTL *SOG1* en *Brassica oleracea*, por lo tanto, pueden considerarse, de hecho, herramientas que permiten la modulación del vigor de las semillas, más particularmente la modulación de la velocidad de la germinación de las semillas en *Brassicaceae*.

El ligamiento entre el grupo de ligamiento C1 de B. oleracea y el brazo superior del cromosoma tres de Arabidopsis se confirma

Estudios sobre SL101 anteriores han mostrado que una sola región sometida a introgresión en el extremo telomérico del grupo de ligamiento C1 (LGC1) contiene el QTL para *SOG1*. En el trabajo actual, tenemos como objetivo establecer la colinealidad entre esta región en *B. oleracea* y el genoma de *Arabidopsis* para posibilitar la comparación con el análisis exhaustivo de QTL realizado en esta especie modelo. Previamente se han mostrado varios ligamientos entre el genoma de *Brassica* y *Arabidopsis* (Cogan *et al.*, 2004; Parkin *et al.*, 2005).

En particular, el ligamiento entre el LGC1 y *Arabidopsis* (Cogan *et al.*, 2004) se utilizó para ayudar en el desarrollo de marcadores informativos adicionales. Usando esta estrategia, se diseñaron pares de cebadores para 30 modelos de genes de *Arabidopsis*, que se propagaron por esta región. Estos cebadores se ensayaron para determinar si amplificaban un producto de *B. oleracea* y después si había algún polimorfismo entre SL101 y las líneas progenitoras A12DHD y GD33DHD (tabla 1). Un patrón de bandas que es igual en SL101 y GD33DHD, pero diferente del de A12DHD indica su presencia en este locus y, por lo tanto, su utilidad como marcador para *SOG1*. Se identificaron cebadores para tres modelos de genes como marcadores informativos (*At3g01190*, *At3g07130*, *At3g02420*, tabla 1) que anclaron el ligamiento entre el brazo superior del cromosoma tres de *Arabidopsis* y la región *SOG1* de LGC1 de *B. oleracea*. Esta confirmación de colinealidad justifica la comparación de *SOG1* con QTL para el rendimiento de las semillas ubicado en esta región del genoma de *Arabidopsis*.

Modelo de gen	Cebadores
<i>At3g01190</i>	F: TTCTTCCACGACTGCTTCG
	R: CTAACAAACTGATCCGTCAC
<i>At3g02420</i>	F: GTTGCGTTGCCATCTGCAG
	R: CAGGCTGAGATAGCCATTGG
<i>At3g07130</i>	F: CTACTAACCATGGAGTTACC
	R: AACGCTGGTGGGATTAC

Tabla 1 Cebadores para marcadores seleccionados usados para anclar la introgresión SL101 en *Arabidopsis*

Conjuntamente, estos resultados abren la posibilidad de usar los alelos *BoIC.VG1.a* A12/GD33 o los alelos *BoIC.VG2.a* A12/GD33 o los alelos *BoIC.VG2.b* A12/GD33 de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 23, en particular para genomanipular plantas en que se ha modulado el vigor de las semillas, más particularmente plantas en que se ha modulado la velocidad de germinación.

Ejemplo 2. Experimentos que resaltan fenotipos adicionales ligados al vigor de las semillas.

Estos experimentos subrayan las diferencias en las características de germinación entre semillas con (SL101) o sin (A12) el alelo GD33.

Las semillas de las líneas A12 y SL101 se originaron en R.U. y se replicaron en 2009 en Sudáfrica mediante un productor de semillas comerciales. La determinación de las características de germinación de las semillas tuvo lugar a primeros de 2010 en Enkhuizen, Países Bajos.

Rendimiento de las semillas en condiciones comerciales convencionales

Se sembraron dos réplicas de 100 semillas en bandejas convencionales rellenas de suelo como en una práctica comercial normal. Las bandejas se colocaron en una cámara de germinación a 18 °C en la oscuridad durante tres días. Las bandejas entonces se transfirieron a un invernadero con un promedio de temperatura de 20 °C. A los 10 días después de la siembra, se contó el número de plántulas desarrolladas normalmente y el número de semillas que no habían brotado.

El rendimiento de SL101 en estas condiciones fue considerablemente mejor que para A12 (tabla 2).

	plántulas normales	semillas no germinadas
A12	19	80
SL101	91	7

Tabla 2 Porcentaje de plántulas normales y porcentaje de semillas que no han germinado, medidos en condiciones prácticas de producción de plántulas

Sensibilidad a la temperatura de la germinación sobre papel

Se sembraron dos réplicas de 100 semillas de cada uno de A12 y SL101 para cada combinación de condiciones sobre papel de filtro húmedo en cajas de germinación de plástico transparentes a temperaturas de 10, 20 o 30 °C. Las cajas se mantuvieron en la oscuridad a las temperaturas mencionadas o se colocaron bajo luz fluorescente.

La germinación, medida como prominencia radical, se contó diariamente. La germinación se contó hasta 10 días después del inicio de la medición cuando no se observó germinación adicional.

Los datos muestran que, en cada condición, el porcentaje de germinación era mayor para SL101 en comparación con A12 (tabla 3).

		temperatura		
		10	20	30
luz	A12	47	94	59
	SL101	94	100	99
oscuridad	A12	65	24	2
	SL 101	95	78	50

Tabla 3 Porcentaje de germinación final de A12 y SL101 a diferentes temperaturas en luz o en oscuridad

Velocidad de germinación sobre papel

La velocidad de germinación se determinó en condiciones de 20 °C en luz, una condición donde ambas líneas tenían su germinación máxima. Se colocaron dos réplicas de 50 semillas por línea sobre papel en cajas de germinación de plástico en las condiciones mencionadas. Se determinó el t50 (tiempo hasta que el 50 % de las semillas en germinación han germinado) (tabla 4).

Como se muestra en la tabla, tiempo hasta el 50 % de germinación fue considerablemente más corto para SL101 en comparación con A12.

línea	t50 (h)
A12	59,0
SL101	47,5

Tabla 4 Tiempo hasta el 50 % de germinación a 20 °C en luz para A12 y SL101

Sensibilidad a bajas temperaturas durante la germinación sobre papel

Se incubaron dos réplicas de 50 semillas por tratamiento a 5 °C o 10 °C en luz como se describe anteriormente para un ensayo de germinación sobre papel. La incubación fue en agua o en una solución 1 mM de GA3. Después de 10 días, se retiraron las semillas que habían germinado. Las cajas con las semillas no germinadas restantes se colocaron entonces a 20 °C en la luz. Después de 5 días más, se contó el número de semillas germinadas. Como comparación, se germinaron semillas de A12 y SL101 a 20 °C en luz sin un pretratamiento. El porcentaje de germinación de estas semillas se contó después de 10 días.

Especialmente a 5 °C, había una gran diferencia entre las dos líneas (tabla 5). El pretratamiento en agua evitó en gran medida la germinación de A12 a 20 °C en luz más tarde. Este no fue el caso para el pretratamiento en GA3 1 mM. SL101 mostró solamente una reducción mínima en la germinación después del pretratamiento a 5 °C en agua.

	A12	SL101
sin pretratamiento	99	100
10 días 5 °C en agua	15	84
10 días 5 °C en GA3 1 mM	100	100
10 días 10 °C en agua	82	99
10 días 10 °C en GA3 1 mM	100	100

Tabla 5 Porcentaje de germinación de semillas de A12 y SL101 con o sin un pretratamiento a 5 o 10 °C en luz con un medio de incubación de agua o una solución acuosa 1 mM de GA3

5 Ejemplo 3 Efecto del genotipo sobre el rendimiento de semillas híbridas

Se produjeron semillas híbridas en condiciones de producción de semillas comerciales en Sudáfrica polinizando flores de dos líneas estériles macho con polen de otras 7 líneas.

10 La línea 1 hembra contenía el alelo GD33, la línea 2 hembra contenía el alelo A12.

Se ensayó la sensibilidad a baja temperatura durante la germinación para estas semillas. Las semillas se incubaron sobre papel de filtro humedecido a 5 °C en luz fluorescente blanca durante 10 días. El porcentaje de germinación se registró después de 10 días y las semillas no germinadas se transfirieron a 20 °C en luz. Después de cinco días, se registró el porcentaje de semillas germinadas.

Las semillas producidas en la línea hembra que contenían el alelo GD33 mostraron germinación considerablemente mayor a 5 °C y germinaron más de un 90 % después de transferencia a 20 °C. Las semillas producidas en la hembra sin el alelo GD33 mostraron solamente porcentajes de germinación bajos y no se recuperaron después de transferencia a 20 °C.

	hembra 1 (GD33)	
	10 días 5 °C	+5 días 20 °C
macho 1	35	96
macho 2	28	96
macho 3	72	94
macho 4	9	96
macho 5	43	100
macho 6	28	99
macho 7	69	97
promedio	41	97

	hembra 2 (A12)	
	10 días 5 °C	+5 días 20 °C
	0	6
	0	10
	19	44
	0	4
	0	8
	0	4
	35	58
	8	19

Tabla 6 Porcentaje de germinación de semillas híbridas producidas usando una línea hembra GD33 o A12 con un pretratamiento durante 10 días a 5 °C en luz seguido de incubación de semillas no germinadas durante 5 días a 20 °C.

Se ensayaron semillas de los mismos lotes de semillas híbridas en un ensayo de germinación sobre papel a 25 °C en luz fluorescente blanca. De los recuentos diarios de germinación, se calculó el tiempo hasta el 50 % de germinación (t50). El porcentaje de germinación final se determinó después de 5 días. Todos los híbridos tenían al menos un 85 % de germinación, la mayoría más de un 95 %. Las semillas producidas en la línea hembra con el alelo GD33 mostraron una germinación de promedio aproximadamente un 25 % más rápida, mostrada por el mejor t50 de 1,33 días frente a 1,80 días para semillas producidas en la hembra con el alelo A12.

	hembra 1 (GD33)	
	% de germ.	t50 (d)
macho 1	100	1,08
macho 2	97	1,95
macho 3	98	1,85
macho 4	100	1,15
macho 5	99	1,07
macho 6	99	1,14
macho 7	95	1,05
promedio	98	1,33

	hembra 2 (A12)	
	% de germ.	t50 (d)
	99	1,73
	98	1,85
	100	1,90
	95	1,84
	98	1,68
	85	1,84
	98	1,79
	96	1,80

Tabla 7 Porcentaje de germinación y tiempo que se tarda hasta el 50 % de germinación (t50) de las semillas híbridas producidas usando una línea hembra GD33 o A12 en luz a 25 °C.

Referencias

- 5 Bettey M., Finch-Savage W.E., King G.J., Lynn J.R. 2000. Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in *Brassica oleracea* L. *New Phytol* 148: 277-286.
- 10 Clercks E.J.M., El-Lithy M.E., Vierling E., Ruys G.J., Blankestijn-De Vries H., Groot S.P.C., Vreugdenhil D., Koornneef M. 2004. Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions Landsberg erecta and Shakdara, using a new recombinant inbred line population. *Plant Physiol* 135: 432-443.
- 15 Finch-Savage W.E., Côme D., Ly J.R., Corbineau F. 2005. Sensitivity of *Brassica oleracea* seed germination to hypoxia: a QTL analysis. *Plant Sci* 169: 753-759.
- 20 Finch-Savage W.E., y Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523.
- 25 Finkelstein R.R., Gampala S.S., y Rock C.D. 2002. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14, S15-45.
- 30 Foolad M.R., Lin G.Y., Chen F.Q. 1999. Comparison of QTLs for seed germination under non-stress, cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breed* 118: 167-173.
- 35 Groot S.P.C., van der Geest A.H.M., Tesnier K.J.Y., Alonso-Blanco C., Bentsink L., Donkers H., Koornneef M., Vreugdenhil D., Bino R.J. 2000. Molecular genetic analysis of *Arabidopsis* seed quality. En M Black, J Vasquez-Ramos, eds, *Seed Biology: Advances and applications*, CAB International., Londres, pág. 123-132.
- 40 Hilhorst H.W.M. y Toorop P.E. 1997. Review on dormancy, germinability and germination in crop and weed seeds. *Advances Agron* 61: 115-165.
- Holdsworth M.J., Bentsink L., Soppe W.J.J. 2008a. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol* 179: 33-54.
- Holdsworth M.J., Finch-Savage W.E., Grappin P., Job J. 2008b. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends Plant Sci* 13: 7-13.
- Ruan S.L., Duan X.M. y Hu W.M. 2000. Occurrence of seed vivipary in hybrid rape (*Brassica napus* L.) and its effect on seed quality. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)* 2000 Vol. 26 n.º 5 pág. 573-578.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Syngenta Participations AG
 <120> Modulación del vigor de las semillas
 <130> PROXXXX
 <160> 18
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 3061
 <212> ADN
 <213> Brassica oleracea
 <400> 1

aaaaagcagg ctaagagtgt aagcgaccca ttccacatcg gatctaaaaa tcatataatc	60
tagagtctga caagaatcaa cggtgataga gagtgcgaga gaatagtaca gagccagtcg	120
tcgaggtaga aatgtttgtc ctgagcccaa atggtatagt tgatattggg attccagaac	180
ttgttatcac ccactatcca tctcttagcg gccacctcag tcaccggagc tgccgcaaga	240
aaagccagaa ccattgcccg agccatcaac gcaagtctag ccatagatca ctctagaaag	300
aaaaagaagc tcagtgtcta atgactctta gtcttatctc tcaagaaata gcagttttat	360
gaatgaatgt atatgagcga gtggggctgt ttccaagtca aatcagacat acaaatttct	420
cgttttacgg ggaagatc tctcaagatc cgtaatttct tcaactaacg tttggaattt	480
tattactact ttaatcaacc tcgatgttga cgatgaagta cacgttaatt aaaggtacgc	540
gttatatagt taaaggagta attagatttt aattgctggc attattatta tttttctctg	600
gtatatTTTT aaaggaatat tttctcacct tttagcgggg aatttatttc cattttcttc	660
tttcaagggt tcagagattc aattccttta ttaacatacg aaatgagtat atagtatctt	720
ttgaatattt aaataattaa aataaaaaata aattaccata acagtgatac atatcaaaat	780
ttccaaaact aatgtgagta cttatattag ttgtacttct tagtaaaata acgagatatg	840
ttatggctcg tcgcatacaa caaagcagag catatgttcc cgcaataaca tgcacacgca	900
actgatagca cgtcgttaacc atttccgcga accaaccaat ggatattgta attcgataag	960
acgacgtcgt gttgttgacc acgaatatTT cttaaatttc cttttatctt ttgtttttga	1020
cgtcatcaca ttggtttatg tccacacgat atcagtcata aaatccacgt agggaaacgac	1080
tatccattac acccatccac gtgttctcat aacagcttct agttccatta gctgaacgaa	1140
caatagaaac agagcatcga actgagaaag aagaagaaga agggaagcaa gagaaatggc	1200
ggcagcggcc atggccgttc atctcccgaa acattcatcg tttcttccta atcccaagct	1260
tccattgaat caaaaactcta acttcctcgg tgtgtccttg aagatcggtc gacccatgtc	1320
cgttaaccgg aaaatgaaag gtccggttac ggtttcagct gcttcgaccg tcgaaggcga	1380

ES 2 788 128 T3

tcgaagcaaa	cagttttaca	taaacttcac	tggattccca	tttcctcttg	gtcctttcct	1440
taaccggcgc	accatcagaa	cagaggttag	gctttctcca	tccctcttga	gttttgattt	1500
gaactcgttg	agaatcccat	atggatgtta	tgcaggcggg	taaaggaagc	atatggatgt	1560
ttgaacaaga	acaagcttta	ggtttcagca	gtgtctctac	caatataaga	atgactgtca	1620
tcagactcaa	atccggtggc	ttatgggttc	atgcccctat	tgctcccacc	aaagagtgtg	1680
ttcaggttcc	ccctttttat	tcattatcct	tgataaagta	tcattccttc	ttatcatttg	1740
ataataacca	atgtctaaac	tcttttttgg	gttgttttgc	aaactttttc	tttgaggcag	1800
cttattgagg	agttgggagc	tccggttgag	tacattgtcc	tgccaacttt	tgcttacgag	1860
cacaagatct	tcgtcgggcc	cttctctaga	aagttcccca	aggctcaagt	atgggtggcg	1920
ccaagacaat	ggagctggcc	actgaactta	ccactcgagt	ttttcgggat	ctttcgcgct	1980
aaaaccatta	aagacggaga	cttatctacc	ccgtgggctg	atgagatcga	gcagaaagtc	2040
ttaagctctc	ctgaagtcgg	tacgttcctt	cactttctca	atcttggttg	ccctccttag	2100
ccaagcctca	gtgaaacatt	cgcctaaacc	cgcactctcc	tcctcttccc	tccaaaatat	2160
ttgaaaagag	ttatatatac	atagcctccc	aagttattaa	aaaaaacgtt	ttgtctccca	2220
aactattgaa	atctttatca	aattgtctat	agcctccaaa	atccgagggg	cggctcctgt	2280
cttatgaaat	aataatatac	aggaatagga	ccgtatgtgg	aagtagcggt	ctaccataag	2340
cgttcaagaa	ctctattagt	cactgatgct	gtgatcttcg	tcccacggaa	gccgccatcg	2400
agtatcagca	gcgagtcctt	gctggcctct	gctaagaacg	gactggctgt	gaagatactt	2460
agcaaaggca	aacaagtacc	tgatgaccct	gtcgttgata	ccccaaacac	ccgccaaaaa	2520
ggtcagccat	cagcttcttg	aaattcaaat	tcatcaaaca	aaagatctcg	atgggtgtct	2580
tttaacgtgc	aggatgggaa	agaatggtgc	tgcaaatacct	gtttcttggt	ccgtctaata	2640
tcttgagacc	aaacgcgagc	ttcgacaaaa	tgtcacagaa	gctgatcggt	tctcccattg	2700
tcaagactct	ggtcttttag	aaagtccctg	agaaggtgag	ggactggatc	gatgagatag	2760
cgagtgactg	gagattcaag	aggataatcc	cagctcattt	cgaggctccg	gtaaacgcag	2820
ggaggtcaga	atttctagct	gcgtttgggt	ttcttgatga	tcttctaggg	gaaagatatg	2880
tgaaccgtcc	tccttcgctc	tctgttctct	tcacttcgct	gatgggtaaa	gcagcgagct	2940
attttctctc	ggatgatatg	aggactctct	cttctcttga	tcagttctta	gtctctgttg	3000
gtgctgttaa	gaagaccgtc	tctggtagaa	aacgaagatg	acggaacaaa	cccagctttc	3060
t						3061
<210>	2					
<211>	5108					
<212>	ADN					
<213>	Brassica oleracea					
<400>	2					

ES 2 788 128 T3

gtaggccaag ccaagcatat ggatcactta gttgagagaa gttatggcaa gaaataagcc	60
atgcagatta gaaaaagagt gcaacaaact aagtacagta ctaaaagact aagttaataa	120
tacaattaaa ccaaaattaa tggatgagta ccttcacaaa acattagtga attttcagac	180
cctctggacc aatacaagac taaggatgtg agacttaact gacagttagt tcatgtaggg	240
ccaataaaca gctcaaattc gttagctttc aagttccaat tttctgcgtt gtgttttgct	300
ttttgaggggt tgatttggaa tttctccaaa gaggtcacat aatttaaaag aaattgatca	360
aaatttatatt ggacaaggca agcaaatcca ttaagaagat cacaacaaaa gaaaaattaa	420
aaaccaacaa aagaaatttc ccatttgacg aaggtgatga acaagatcag tacgtatact	480
ccaccaatgc atgacactac tgaaaacata gacaaacaag gtcgtgatag ttgtgaccac	540
ctcacacatg aaaaaactcc atgaatgtca aaagtttgca cgattatgta aacacttaat	600
cacttattca ttgaaggata atgttggaca gaattattatc attgtttcta atggtaagca	660
taagcaaaca ttgtaaaaag aagtcatgat catgctatat cttataggag tttaatttat	720
tccaagttca catttagtga tgctctaatac ttcaacaata aaacataacc aactgatagt	780
cagagtaacc aattgaatgc cagttttcaa aagaaataat acatatctaa ctgatagtca	840
gtcaaatcaa ccaataaagt agaaagaacc aaacaaacac aactaggggt ggacacttcg	900
attattttgt aggttcgggt tggattcgggt tcggtttggt taattttattc tagaattttt	960
taaactgaag taaaccataa gtttcagtct gatttgtatt cggcatgggt tgtgtttcag	1020
ttcagtttaa tcggattccc ttaatttaat tcttttaaga aaaatcatgt tttaaaacac	1080
ggtcatgaaa tcatcatggt ggtgactatg aaaaaataaa ttatataatt aaatctaata	1140
tataactgaa acaaaaatcc taaaaaacca caaaaaaatt tataagaaca caatcaaacc	1200
aaagttaact aaagtaaata gaaaattaaa aaaaaacaa tgtcaataaa gttaatactg	1260
actttagtgt taggatttag tataaaaatg tttaattcaa ataataacaa agacacattg	1320
gtttttcgggt gcaatttgat tcggttcgat tcggttcgggt ctgatttttt tgcttgtctg	1380
aacacaacga cggccgacag ataacttttt aaacgttacg tgaaaatgta ttggactatt	1440
gggccttagt aaaggctaata gaacagatta aatgggctta tagacgcaat tgcattggtat	1500
ctatcgggaa gcataaatcg tcaagtaatt caatttaggg gactcatttg caatttgtgc	1560
aaagatttta gctgtacaga gtagggctga acataaaatc cgtaaccgga aatccgaacc	1620
gaaccgaaaa acccgatccg tacccgatcc aaaatgtaaa aaatacctca atgaatattg	1680
taggggtgta taaaatatat ctgaaccgga agtgttatta accgaaccg aacggataat	1740
ccgaaaaccc gaaaaaccaa aaaattcgaa aaaatatccg aaaaaactga tccgaatgcg	1800

ES 2 788 128 T3

taaattaata taaaatataa atatttgaaa catacattgg atatgatato taacaataag	1860
tattttaaata ttaaataaat actttaata ctccattata taaaaagaag tatatatattt	1920
ttatgtttta cttttgaatt ttagatttta ctatggatat atccgagccg atccgatata	1980
atccgaatcc gaatgttata tggctacttt ggatataatct gaaccgatcc gaaaccgaag	2040
ttgttatatc cgaatctcat ccgtacttgt aaatttacta gaatgagaca taggggatga	2100
tacaaaatag aaccgaaatc cgaaaaaacc gatccgaacc cgaacgccga ggcctagtac	2160
agagtccga tcaagagatag agagaatcct ttgagcgtcg gccttgcttt gtgcgtaggg	2220
atcatctccg actaatgtt gtaattataa agggcgcccg cgccttttta gcggagagat	2280
ggcgagctca cagttcaggt atacgcagac gccgtcgaag gtggtgcacc tgaggaatct	2340
gccgtgggaa tgcgtggaag aggagctcat cgacctatgc aaacgattcg gcaagatcgt	2400
caatacgaag accaatgtcg gcgccaatcg caaccaagcc tttgtcgaat tcgtaacaac	2460
tttttattct cttggatcat cagattgttt ctttttttgg tatctcgttg ttgttttgg	2520
attgttgttt tgaagatgaa actgtatact ttgattcata ttgcgagggg gacgtgaatc	2580
aggcaatatc aatggtttct tactatgctt cgtcttcaga gccggctcag attcgaggga	2640
agactgttta tattcagtac tctaatcgcc atgagattgt caacaatcag agtcctggag	2700
aggccctgg caatgtctc ttggtcacct ttgaaggagt ccaatctcac catgtctgca	2760
tcgatgtcat ccatctggta tgtgaatatt cagcttacct tccactattg tttcttgta	2820
tgttaagtga tttttttcgt ttcttcgagt agattctaata ctatgaaaat atttcaactt	2880
gttgttatta ggcaaaacttc ttttgagtgt atttttttcc acttattgtt agacatacag	2940
tatgtcacat actattgtaa attacagtat atctgacgtt aatgaaaatg ctcgaaatcac	3000
agatgttgat gcctctttat tataatcttt ctggagagag tttggaaaat agtttcatgt	3060
tcgtcattct catggacagg tgtcactctg cacttatcta gtcattctct tttttagtct	3120
cctaatttga gtttatttcg attgatttgc ttcccttagt tattatcaat ttactccact	3180
gtattatatg gacatgactc atatctagtc caaacttttg tttcaggtgt tttctgctta	3240
tggcttcgtg cacaaaattg ccacttttga gaaagctgct ggtttccagg ttagagatat	3300
cgagttttgt tttcaaggtc ttgcataaat ctaatgatgt ttaaactcat cgtctgccgt	3360
cataacctgc tcaggcactt gttcagttta ctgatgtgga cactgcctta gcggcaagga	3420
ctgcgctgga tggtagaagt ataccaagt atgctcaaat ccttcattca tgettttgac	3480
cataagataa agctctgttg atggtttctt ctttttcttt tggtaaattc agatatctgc	3540
ttccagaaca tgtaggctca tgcaatttgc gaatgtctta ctgagctcat actgatctaa	3600
atatcaaatt tcagtcctac cgcagcaggt agagttttga gtcctcgcaa atgtgcctct	3660
ccattgttat actgctctta ctggttgaag ccttatgggt gaatagttac ttcattgtgt	3720

ES 2 788 128 T3

taattctctt acgcactcag ggactacaca aatccatacc ttccggtgaa tcaaaccgct	3780
atggacgggt ctatgcaggt atatctttcc tttgatctaa tcttatctcc aacagcttat	3840
attattctta cactgaatgc gtttgtatta cgttactgat cgtctttgtc catcactgcg	3900
ttcagcctgc tttgggtgct gatggaaaga gggttgaaac tcagagcaac gtcctgcttg	3960
ctttgattga gaatatgcag tacgctgtca ccgtggatgt tcttcacacg gtgaggaaca	4020
acaatatgcc tgtttcttca tctcatcatg ctttcatatc tcaaaattaa ctattccttt	4080
gcttctcata ggtgttttcc gcttatggaa ctgtgcagaa gattgcaata tttgagaaaa	4140
atggttcaac gcaagcctta attcaatact ctggtacatg accttgataa tctgaataca	4200
tatatgattc tactatactt cttttggtta tatggtgaat cttcttatgt gtatgcaaag	4260
agaagagcct aagaatttga atatagtcac cgtttgcttc atgttccgtt ttattgattc	4320
ttctgtagac atttcaacgg cgacgatggc gaaagaagca ctggagggac actgcatata	4380
tgacggaggc tactgtaagc ttcgactaac ttactctcgg catactgatc tcaatgtaaa	4440
ggtacataag atcagttgct ttatgtaccc aaacaaaaag tgcagttaaa gagaataaga	4500
agtgatttct gcaagaaccg catgcttttt tctcatcaac aattgagtga aatctgaatt	4560
cgacattcta gttgattcaa ctaatgattt tcgtcttctt tcttcaggca tttagcgaca	4620
aaagcagaga ctacacactg cctgatctaa gccaaactgg gggccaaaag gttccaggag	4680
tggctgcagc tagtgggcca acagatggtt ggccaatgg gcagggtgag actcaataca	4740
tgggaagttc gtatatgtac ccaccagctg atcccacagg agcttcacct tcttctggtc	4800
atcctcctta ttatggttga tccatgtact gttttctact ttatataaat ttcggattat	4860
gttgaagact agtttccatg ttataggttt caggtaaaag tgtgttggtc ttttatttgg	4920
ttaaataaac atgggaaaac caataatatt atgtagtata atttataaac attgtgtatt	4980
tgtttctatt tgactttgtt atggagcttc cgaagtgtta gagcttcttt ttctcgtact	5040
ttaaactggt tcattcctgg atttgtttga agatctgcag acttacactt tagtgacttt	5100
tggtatcc	5108
<210> 3	
<211> 3025	
<212> ADN	
<213> Brassica oleracea	
<400> 3	
aaaaagcagg ctaagagtgt aagcgaccca ttccacattg gatctaaaaa tcaaataatc	60
tagagtgtga caagaatcaa cgttgataga gagtgagaga gaatagtaca gagccagtcg	120
tcgaggtaga aatgtttgtc ctgagcccaa atggtatagt tgatattggg attccagaac	180
ttgttatcac ccactatcca tctcttagcg gccacctcag tcaccggagc tgccgcaaga	240

ES 2 788 128 T3

aaagccagaa ccaactgccgc agccatcaac gcaagtctag ccatagatca ctctagaaag	300
aaaaagaagc tcagtgcctg atgactctta gtcttatctc tcaagaaata gcagttttat	360
gagtgcgtgg ggctgtttcc aagtcacaaac agacatacaa atttctcggt ttacggggaa	420
aagatctctc aagatccgta atttcttcaa ctaacgtttg gaatcttatt actacttta	480
tcaacctcga tgttgacgat gacgtacacg ttaattaaag gtacgcgtta tatagttaag	540
ggagtaatta gattttaact gctggcatta ttattatttt tctctgggta ttacattatt	600
ctgttttgta gtaatatfff ctcacctfff agggcggaat ttatttccat tttcttcttt	660
caagggttca gagattcaat tcctttatta acatacgaaa tgagtatata gtatctttta	720
aatattttaa taattaaaat aaaaataaat tactataaca gtgatacata tcaaaatttc	780
caaaactaat gtgagtactt atattagttg tacttcttag taaaataacg agatatgtta	840
tggctcgtcg catacagcaa agcagagcat atgttcccgc aataacatgc acacgcaact	900
gatagcacgt cgtaaccatt tccgcgaacc aaccaatgga tattgtaatt cgataagacg	960
acgtcgtggt gttgaccacg aatatctctt aaatttcctt ttatcttttg tttttgacgt	1020
catgacattg gtttatgtcc acacgatatc agtcataaaa tccacgtagg aacgactatc	1080
cattacaccc atccacgtgt tctcataaca gcttctagtt ccattagctg aacgaacaat	1140
agaaacagag catcgaaactg agaaagaaga agaagaaggg aagcaagaga aatggcgga	1200
gcggccatgg ccgttcatct cccgaaacat tcatcgtttc ttacgaaacc caagcatcca	1260
tccgatcaaa actctaactt tctcgggtggg tccttaaagt tcggtcgatc catgtctcta	1320
aaccggaaaa ctaaagggtc agttatgggt tcagctgctt cgaccgtcga aggcgatcga	1380
agcaaacagt tttacataaa cttcactgga ttcccatctc ctcttggtcc tttccttaac	1440
cggcgcacca tcagaaccga ggttaggctt tctccatccc tcttgagttt tgatttgaac	1500
tcgttgagaa tcccatatgg ataagtgtat gcaggcggtt aaaggaagca tatggatgtt	1560
tgaacaagaa caagctttag gtttcagcag tgtctcaacg aatataagaa tgactgtcat	1620
caaaactcaa tccggtggct tatgggttca tgcccctatt gctcccacca aagagtgtat	1680
tcaggttccc tcttttatcc attatcagta tcatcctttc ttatcatttg ataaattaac	1740
caatgtctaa actctatfff ggggtgtfff gcttactfff tctttggggc agcttattga	1800
ggagtggga gctccggtg agtacatcgt cctaccaacc ttcgcttacg agcacaagat	1860
cttcgctggt cccttctcta gaaagttccc caaggctcaa gtatgggtgg cgccaagaca	1920
atggagctgg ccaactgaact taccactcga gtttttcggt atctttcgcg ctaaaaccat	1980
taaagacggt gacttgtcta ccccggtggc tgatgagatc gagcagaaag tcttaagctc	2040
tcctgaagtc ggtacgttcc ttcactttct caatcttgtt ggccctcctt agccaagcct	2100

ES 2 788 128 T3

cataaaacat tgcgttcaac cctcacccc acccaaattt tttgaaaaa gttacatata	2160
catagcccca aatttattaa aaaaatctat tgaaatcttt attaaattat ctacgtcccc	2220
tagaatctga gggtcggccc tgtacttatg gaataaataa tatacaggaa ttggaccgta	2280
tgtggaagta gcgttctacc ataagcgttc aagaactcta ttagtcaccg acgctgtgat	2340
cttcgtccca aagaagccgc catcgagtat cagcagcgag tctttgctgg cttctgctaa	2400
gaacggactg gctgtgaaga tacttagcaa aggcaaacaa gtacctaatg accctgtcgt	2460
tgatacccca aacaccgcc aaaaaggcca gccatcagct tcttgaaatt caaatcatc	2520
aaacaaagat ctcaatgggt gtcttttaac gtgcaggatg ggaaagaatg gtgctgcaaa	2580
tcctgtttct cggcccatct aatctcttgg agccaaacgc gagctttgcg caaatgtcac	2640
agaagctgat agtttctccc attgtcaaga ctctggtctt tagcaaagtc cctgagaagg	2700
tgagggactg gatcgatgag atagcgagtg actggagggt caagaggata atcccagctc	2760
atctcgaggc tccgataaac gcggggaggt cagagtttct agctgcgttc gggtttcttg	2820
atgatcttct aggggaaaga tatgtgaacc gtctctcttc gctctctgtt ctctttactt	2880
cgctgatggg taaagctgcc agctattttc ctccgatga tatgagaact ctctctctc	2940
ttgatcagtt cttagtctct gttggtgctg ttaagaagac cgtctctggt agaaaacgaa	3000
gatgacggaa caaaccagc tttct	3025
<210> 4	
<211> 4992	
<212> ADN	
<213> Brassica oleracea	
<400> 4	
gtaggccaag ccaagcatat ggatcactta gttgagagaa gttatggcaa gaaataagcc	60
atgcagatta gaaaaagagt gcaacaaact aagtacagta ctaaaagact aagttaataa	120
tacaattaaa ccaaaattaa tggatgagta ccttcacaaa acattagtga attttcagac	180
cctctggacc aatacaagac taaggatgtg agacttaact gacagttagt tcatgtaggg	240
ccaataaaca gctcaaattc gttagctttc aagttccaat tttctgcgtt gtgttttgct	300
ttttgagggg tgatttggaa tttctccaaa gaggtcacat aattttaaag aaattgatca	360
aaatttatatt ggacaaggca agcaaatcca ttaagaagat cacaacaaaa gaaaaataaa	420
aaaccaacaa aagaaatttc ccatttgacg aaggtgatga acaagatcag tacgtatact	480
ccaccaatgc atgacactac tgaaaacata gacaacaag gtcgtgatag ttgtgaccac	540
ctcacacatg aaaaaactcc atgaatgtca aaagtgtgca cgattatgta aacacttaat	600
cacttattca ttgaaggata atgttgaca gaatattatc attgtttcta atggtaagca	660
taagcaaaca ttgtaaaaag aagtcatgat catgctgtat cttataggag ttttaatttat	720

ES 2 788 128 T3

tccaagttca catttagtga tgctctaata ttcaacaata aaacataaacc aactgatagt	780
cagagtaacc aattgaatgc cagttttcaa aagaaataat acatatctaa ctgatatgtca	840
gtcaaatcaa ccaataaagt agaaagaacc aaacaaacac aactagggtg gacacttoga	900
ttattttgta gggtcggttt ggattcggtt cggtttggtt aattttattct agaatttttt	960
taactgaagt aaaccataag tttcagtctg atttgtattc ggcatgggtt gtgtttcagt	1020
tcagtttaat cggattccct taatttaatt cttttaagaa aaatcatgtt ttaaaacatg	1080
gtcatgaaat catcatgttg gttactatga aaaaataaat tatataatta aatctaatat	1140
ataactgaaa caaaaatcct aaaaaaccac aaaaaatttt ataagaacac aatcaaacca	1200
aagttaacta agtaaatag aaaattaaaa aaaaaacaa tgtcaataaa gttaatactg	1260
acttttagtg taggatttag tataaaaatg ttttaattcaa ataataacaa aaacacattg	1320
gtttttcggg gcaatttggt cggtttgatt cggttcgggc tgattttttt gcttctctga	1380
acacaacgac ggccgacaga taacttttta aacgttacgt gaaaatgtat tggactattg	1440
ggccttagta aaggctaata aacagattaa atgggcttat agacgcaatt gcatgggtatc	1500
tatcgggaag cataaatcgt caagtaattc aatttagggg actcatttgc aatttgtgca	1560
aagattttag ctgtacagag tagggctggg cataaaatcc gtaaccgaa atccgaaccg	1620
aaccgaaaaa cccgatccgt acccgatcca aaatgtaaaa aatacctcaa tggatattgt	1680
agggtgttat aaaatatatc tgaaccgaa gtgttattaa ccgaaccgga acggataatc	1740
cgaaaaccgg aaaaaccaa aaactcgaaa aaatatccga aaaaactgat ccgaatgcgt	1800
aaattaatat aaaatataaa tatttgaaac atacattgga tatgatattc aacaataagt	1860
atttaaaatt taaataagta ctttaaaatc tctattatat acaaagaagt atatatattt	1920
tatgttttac ttttgaattt tagattttac tatgtatata tccgagccga tccgatacaa	1980
tccgaatccg aatgttatat ggctattttg gatatatctg aaccgatccg aaaccgaagt	2040
tggtatatcc gaatctcatc cgtactggta aatttactag aatgagacac gggggatgat	2100
acaaaataga accgaaatcc gaaaaaacg atccgaaccg aacgcccagg cctagtacag	2160
agttccgac agagatagag agaatccttt gagcgtcggc cttgctttgt gcgtagggat	2220
catctccgac taattgttgt aattataaag ggcggccgag ccttttttagc ggagagatgg	2280
cgagctcaca gttaggtat acgcagacgc cgtcgaagggt ggtgcacctg aggaatctgc	2340
cgtgggaatg cgtggaagag gagctcatcg acctatgcaa acgattcggc aagatcgtca	2400
atacgaagac caatgtcggc gccaatcgca accaagcctt tgtcgaattc gtaacaactt	2460
tttattctct tcgatcatca gattgtttct gaagctttgt gatttctatg atgaactctt	2520
ttttttttgg tatctcgttg ttgttttggt attgttgggt tgaagatgaa actgtatact	2580
ttgattcata ttccgagggt gacgtgaatc aggcaatatc aatggtttct tattatgctt	2640

ES 2 788 128 T3

cgtcttcaga gccggctcag attcgaggga agactgttta tattcagtac tctaatacggc	2700
atgagattgt caacaatcag agtcctggag aggtccctgg caatgtcctc ttggtcacct	2760
ttgaaggagt ccaatctcac catgtctgca tcgatgtcat ccatctggta tgtgaatatt	2820
cagcttacct tccactattg tttcttggtta tgttaagtga tttttttcgt ttcttcgagt	2880
agattctaata ctatgaaaaat atttcaactt gttgttatta ggcaaacttc ttttgagtgt	2940
atTTTTTTcc agttattgtt agacatacag tatgtcacat actattgtaa attacagtat	3000
atctgacgtt aatgaaaaat ctcgaaatcac agatgttgat gcctctttat tataatcttt	3060
ctggagagag tttggaaaaat agtttcatgt tcgtcattct catggacagg tgtcactctg	3120
cacttatcta gtcattctct tttttagtct cctaaccctg caacatttga gtttatttctg	3180
attgatttgc ttcccttagt tattatcaat ttactccact gtattatatg gacatggctc	3240
atatctagtc caaacttttg tttcaggtgt tttctgctta tggcttcgtg cacaaaattg	3300
ccacttttga gaaagctgct ggtttccagg ttagagatat cgagttttgt tttcaaggtc	3360
ttgcctaaat ctaatgatgt ttaaactcat cgtctgccgt cataacctgc tcaggcactt	3420
gttcagttta ctgatgtgga cactgcctta gcggcaagga ctgcgctgga tggtagaagt	3480
ataccaagt atgctcaaat ccttcattca tgcttttgac cataagataa agctctgttg	3540
atggtttctt ccttttctt tggtaaattc agatatctgc ttccagaaca tgtaggctca	3600
tgcaatttgc gaatgtctta ctgagctcat actgatctaa atatcaaatt tcagtcccac	3660
cgcagcaggt agagttttga gtcctcgcaa atgtgcctct ccattgttat actgctctta	3720
ctgttggaag ccttatggtt gaatagttac ttcatgtgtt taattctctt acgcactcag	3780
ggactacaca aatccatacc ttccggtgaa tcaaaccgct atggacgggt ctatgcaggt	3840
atatttttcc tttgatctaa tcttatctcc aacagcttat attattctta cactgaatgc	3900
gtttgtatta cgttactgat cgtctttgtc catcactgcg ttcagcctgc tttgggtgct	3960
gatggaaaga gggttgaaac tcagagcaac gtcctgcttg ctttgattga gaatatgcag	4020
tacgctgtca ccgtggatgt tcttcacacg gtgaggaaca acaatatgcc tgtttcttca	4080
tctcatcatg ctttcataac tcaaaattaa ctattccttt gcttctcata ggtgttttcc	4140
gcttatggaa ctgtgcagaa gattgcaata tttgagaaaa atggttcaac gcaagcctta	4200
attcaatact ctggtacatg accttgataa tctgaatata tatatgattc tactatactt	4260
cttttggtta tatggtgaat cttcttatgt gtatgcaaag agaagagcct aagaatttga	4320
atatagtcat cgtttgcttc atgttccgtt ttattgattc ttctgtagac atttcaacgg	4380
cgacgatggc gaaagaagca ctggagggac actgcatata tgacggaggc tactgtaagc	4440
ttcgactaac ttactctcgg catactgatc tcaatgtaaa ggtacataag atcagttgct	4500

ES 2 788 128 T3

ttatgtaccc aaacaaaaag tgcagtcaaa gagaataata agtgatgtct gcaagaaccg	4560
catgcttttt tctcatcaac aattgagtga aatctgaatt cgacattcta gttgattcaa	4620
ctaataatgtt tcgtcttctt tcttcaggca ttttagcgaca aaagcagaga ctacacactg	4680
cctgatctaa gccaaactggg gggccaaaag gttccaggag tggctgcagc tagtgggcca	4740
acagatgggt ggcccaatgg gcaggtgcag actcaatata tgggaagttc gtatatgtac	4800
ccaccagctg atcccacag agcttcacct tcttctggtc atcctcctta ttatggttga	4860
tccatgtact gttttctact ttatataaat ttcggattat gttgaagact agtttccatg	4920
ttataggttt caggtaaaag tgtgtgtgtc ttttatttgg ttaaataaac atgggaaaac	4980
caataatatt at	4992
<210> 5	
<211> 4993	
<212> ADN	
<213> Brassica oleracea	
<400> 5	
acgtctatga ccggagtagt ctccttcgtg aagaccggtc actgaaacgc gaatgatgtt	60
cgccataatc tcccatttct ttgaaggtat ttgaacgggt tgggtgggttg attgaggcgg	120
atcttaagca gctcgagtgg atctaatacag ctgagagaaat cggggagacg attagatcat	180
gcggtgacag attcgagagg aaaccctaata cgccatcgcc gccagagagt ctcattgtgca	240
gtgtgattca tatgcaaata tcgtggattt gggtgttttt ttctttttca gggttgattt	300
ggaatttctc taaagaggtc acattaatta aaataaacta gacccttatc cgcgcgccag	360
cgcagatatg aatttttagt ttttaattat ttattttatt caatgatgta tttgtaatat	420
tcgttcatat tatattcgtt aagtaaataat ttttttgtat cttaaaactat ctattttttt	480
acgaatgtgt gatatcatat aaaaatatta aaaaatgagt atagagttaa taagataatt	540
ttaaaaaacag aaatttttct ttogtgtgag atatcatata aataatgatc cgcccagtta	600
acaaaaatca tgattatttt atgtgtaatt ttctttattt tgactatttc cttaaaacta	660
tattaaattt tacatatttt aattagaata tttttaatat ctttaccttt ttatttgaaa	720
tgcaactcaa tatTTTTTTT taacaattat aacaaaatat ttaaaaaata tttttagaat	780
ttgtttgaaa aatatgaaaa ttacatttta aattaaaatt atcctaaaat atgataagtt	840
ttgatgtaaa cgaaaactca aattatgtca aaaataatga tattcaatga taataacaat	900
tttaattgat tatTTTTTTT aaaatacatt tacaaaaata ttgtttgaaa gaaaattcat	960
ttatctttca aatataaaat gaaaatatta taattaaata ataaaaata taaataaaaa	1020
ccataaattt agcaaatgac aactgagtta tattatgcta aaaaaaatt tctaacaaaa	1080
tatcaaatga caaatgagtt atgagtaaat aataccatat aattttttaa aacatagcca	1140

ES 2 788 128 T3

ttcttaaata ttttttgaat aaataattat tttaaattta atcaactaaa aataatatct	1200
gtacaattgt gtgagtcaaa ttctagtttt attgatgcat gttatatatt agtgctgcat	1260
gttttaggta acattttaat gatgcacggt ttcaaaaatc tccattatta aaattatgca	1320
cgtaatgata actcatgagt tttttttggt gattaaatga cattatgtcc aaatttatct	1380
aaggatatct cattaaggta agtgaaaaag acaacaata aaataggaag tttaaatca	1440
tttaagcata tttcattaat gtaactgaaa agacaagtaa taaattaggc agttttattc	1500
gttttatgat atttcataaa tgcaactgga aaagacaaac aaaaaaaat agggagtta	1560
attaatgaaa taagaacatt ttcaaatgag tacttctctt ttaataatat agatttcatt	1620
aatgtaactg aaaagacaag taataaatta ggcagtttta ttctgttttag tatatttcat	1680
aatgcaact gaaaaagaca agaaaaaaa ataaagaatt taattaatga agtaagaata	1740
ttttcaaatg agtattttct ttttaataat atagattgat caaaaattat attggataag	1800
gcaagcaaaa tccattgaga agatcacaaac acaaaaagaa aggaacaaac acacaaccac	1860
ggcgacagat aactaaaatg tactggacta ttggggccctt aatataggct aatgaacaga	1920
ttaaatgggc taattataga cgtcattgca tggatccat ctatctggaa gcatagtaat	1980
ttgttttagg ggactgggtt gcaattttta cagatatttt agctgtacag tacagagaga	2040
gaatcctttg agcgtcgtcg gccttgcttt gtgtgtaggg atctccgact gactaattgt	2100
tgtaactaca aaagggcgcc ccccgcgctt tttactaga tggcgagctc atcacagttt	2160
aggtataccc agacgccgtc gaagggtgtg cacctgagga atctgccgtg ggaatgcgtg	2220
gaagaggagc tcatcgacct atgcaaacga ttgggcaaga tctgcaatac gaagaccaat	2280
gtcggcgcca atcgcaacca agcctttgtc gaattcgtaa gaacttttta ttctcttgga	2340
tcatcagatt gttgcttccc ccccaatgga tttgggtaga aattgaataa aaaaaggact	2400
cgaactcttt ttttggatc tcgttgttgt tttgaagatg aaactgtata ctttgattca	2460
tattcgcagg gtgacgtgaa tcaggcaata tcaatggttt ctactatgc ttctcttca	2520
gagccggctc agattcgagg gaagactgtt tatattcagt actotaatcg ccatgagatt	2580
gtcaacaatc agagtcctgg agaggtccct ggcaatgtcc tattgggtcac ctttgaagga	2640
gtccaatctc accatgtctg catcgatgtc atccatctgg tatgtgaata ttcagcttac	2700
cttccactat tgtttcttgt tatagtattt ttttctgtt ctctgagtag attotaatct	2760
atgaaaatat ttcaacttgt tgttattagg caaacttctt ttgagtgtat ttttttccag	2820
ttattgttag acatacagta tgtcacatac tattgtaaat tacagtatat ctgacgttaa	2880
tgaaaatgct cgaatcacag atgttgatgc ctctttatta taatctttct ggagagagtt	2940
tggaaaatag tttcatgttc gtctttctca tggacagggt tcaactctgca cttatctagt	3000
cattctcttt tttagtctcc taatttgagt ttatttcgat tgatttgctt cccttagtta	3060

ES 2 788 128 T3

ttatcaatth actccactgt attatatgga catgactcat atctagtcca aacttttggt	3120
tcagggtgttt tctgcttatg gcttcgtgca caaaattgcc acttttgaga aagctgctgg	3180
tttccagggt agagatatcg agttttgttt tcaagggtctt gcctttttca taaaatctaa	3240
tgatgtttaa actcatcatc tgccgtcata acctgctcag gcacttggtc agtttactga	3300
tgtggacact gccttagcgg caaggactgc gctggatggt agaagtatac ccacgtatgc	3360
tcaaatcctt cattcatgct tttgaccata agataaagct ctgttgatgg tttcttcctt	3420
ttcttttggt aaattcagat atctgcttcc agaacatgta ggctcatgca atttgcgat	3480
gtcttactca gccacactg atctaaatat caaatttcag tcccaccgca gcaggtagag	3540
ttttgagtcc tcgcaaatgt gccattccat tgttttactg ctccctactgt tggaagcctt	3600
atggttgaat agttgattca tgtgttttga ttttctgacg tactcaggga ctacacaaat	3660
ccatatcttc cggatgaatca aactgctatg gatgggttcta tgcaggtaaa tatttcctct	3720
ttctagtcta tctccaacag cttagacaat tcttacattg aatgcgttac tgattgtctt	3780
tgacgtcatt gcattcagcc tgctttgggt gctgatggaa agagggtaga aactcagagc	3840
aacgtcctac ttgctttgat tgagaatatg caatacgtg tcacacgggt aggaacacca	3900
ttatgcacgt ttctgcatct cagcatcctt tcattttctca aaattaatta tttcctttgc	3960
ttgtcatagg tgttttccgc ttatgggact gtgcagaaga ttgcaatatt tgagaaaaat	4020
ggttcaacgc aagccttaat tcaatactct ggtacatgac cttgatgatc tgaatacata	4080
tattattata ctatacttct ttccggttata tggcgaatca tcttatgtgt atgctaagaa	4140
tttgaatagt catcatttgc ttcatgttcc gttttcttga ttcttctgta gacataccaa	4200
cggcgacaat agcgaaagaa gcattggagg gacactgcat atatgacggg aggctactgt	4260
aagcttcgac taacatactc gtcatactga tctcaatgta aaggtagcta agatcagttg	4320
ctttcttgat ttgtgcaccc aaacaaaaaa gcttggggaa agagaataat aacttatgtc	4380
tgcaagaacc atatgctatt ttttttctct tcaacaattg tatgaaatct gaattcgact	4440
ttctagttta ttcaactagt gatttttctg ctcttttctt caggcattta gtgacaaaag	4500
cggagactac aactgcctg atctaagcca actgggtggc caaaagggtc caggagtggc	4560
cgtgctagt gggccaacag attgttggca caatgggcag gtgcagactc aatacacaag	4620
aagttcatat atgtaccac tgtaagcaaa ggtactagat tttgataaag cgcgagtta	4680
tttttaaatt tttttcaatt gacaaatatt tagtaaatgt catattttca tatatttggtg	4740
ttttatttta taaaagactt aaacttttta tctttattta tcgtatttta ttttaaatga	4800
ctatttatgt ttaaaaaatt aaactttatt tctttaatga attaagttga tataactctg	4860
ataaattaat tttattatgt ggttaatat ttaattaaaa aaaattatat acttttaata	4920
aagatttgta tttttcaatg aaaaaattca atttttttta tgaatgctta aattatatta	4980
agaaaagaaa aga	4993
<210> 6	
<211> 4992	
<212> ADN	
<213> Brassica oleracea	
<400> 6	

ES 2 788 128 T3

acgtctatga cgggagtagt ctcttctgtg aagaccggtc actgaaacgc gaatgatggt	60
cgccataatc tcccatcttct ttgaaggtat ttgaacgggt tgggtgggttg attgaggcgg	120
atcttaagca gctcgagtgg atctaatacag ctgagagaat cggggagacg attagatcat	180
gcggtgacag attcgagagg aaaccctaata cgccatcgcc gccagagagt ctcattgtgca	240
gtgtgattca tatgcaaata tcgtggattt ggttgttttt ttctttttca ggtttgattt	300
ggaattttctc taaagaggtc acattaatta aaataaaacta gacccttata cgcgcgccag	360
cgcagatatg aatttttagt ttttaattat ttattttatt caatgatgta tttgtaatat	420
tcgttcatat tatattcgtt aagtaaataat ttttttgat cttaaaactat ctattttttt	480
acgaatgtgt gatatcatat aaaaatatta aaaaatgagt atagagttaa taagataatt	540
ttaaaaacag aaatttttct ttcgtgtgctg atatcatata aataatgatc cgcccagtta	600
acaaaaatca tgattatttt atgtgtaatt ttctttattt tgactatttc cttaaaacta	660
tattaaattt tacatatttt aattagaata tttttaatat ctttaccttt ttatttgaaa	720
tgcaactcaa tattttttttt aacaattata acaaaatatt taaaaaatat ttttagaatt	780
tgtttgaaaa atatgaaat tacattttta attaaaatta tcctaaaata tgataagttt	840
tgatgtaaac gaaaactcaa attatgtcaa aaataatgat attcaatgat aataacaatt	900
ttaattgatt atttttttaa aaatacattt acaaaaatat tgtttgaaag aaaattcatt	960
tatctttcaa atataaaatg aaaatattat aattaaataa taaaaaatat aaataaaaac	1020
cataaattta gcaaatgaca actgagttat attatgctaa aaaaaattt ctaacaaaat	1080
atcaaatgac aaatgagtta tgagtaaata ataccatata attttttaaa acatagccat	1140
tcttaaatat tttttgaata aataattatt ttaaatttaa tcaactaaaa ataatatctg	1200
tacaattgtg tgagtcaaat tctagtttta ttgatgcatg ttatatatta gtgctgcatg	1260
ttttaggtaa cattttaatg atgcacgttt tcaaaaatct ccattattaa aattatgcac	1320
gtaatgataa ctcattgagt tttttgttg attaaatgac attatgtcca aatttattta	1380
aggatatttc attaaagtaa gtgaaaaaga caaacaataa aataggaagt ttaaatcat	1440
ttaagcatat ttcattaatg taactgaaaa gacaagtaat aaattaggca gttttattcg	1500
ttttatgata tttcataaat gcaactggaa aagacaaaca aaaaaaata gggagttaa	1560

ES 2 788 128 T3

ttaatgaaat aagaacatth tcaaagagat acttctctth taataatata gatttcatta	1620
atgtaactga aaagacaagt aataaattag gcagthththt tctgththtagg ataththcata	1680
aatgcaactg aaaaagacaa gaaaaaaaaa taaagaatth aattaatgaa gtaagaatat	1740
ththcaaatga gtactthctct ththaataata tagattgatc aaaaattata ttggataagg	1800
caagcaaat ccattgagaa gatcacacaa acaaaagaaa ggaacacaa cacaaccacg	1860
gcgacagata actaaatgt actggactat tgggccctta atagagcta atgaacagat	1920
taaatgggct aattatagac gtcattgcat ggtatccatc tatctggaag catagtaatt	1980
tgtththaggg gactggthth caathththac agataththta gctgtacagt acagagagag	2040
aatctththga gcgtcgthcg ccttgctthth tgtgtaggga tctccgactg actaattgtt	2100
gtaactacaa aagggcgccc ccgcgcctt ththactagat ggcgagctca tcacagthta	2160
ggtataccca gcgcgctcg aagggtggtgc acctgaggaa tctgccgtgg gaatgcgtgg	2220
aagaggagct catcgaccta tgcaaacgat tcggcaagat cgtcaatacg aagaccaatg	2280
tcggcgccaa tcgcaaccaa gcctthththgc aaththththac aactthththt tctctthggat	2340
catcagattg ttgctthcccc ccaatggat ththgththgaa attgaataaa aaaaggactc	2400
gaactctthth ththgththct cgtththththt ththgaagatga aactgtatac ththgattcat	2460
aththgcaggg tgacgtgaat caggcaatat caatgththt ththactatgct tctctthcag	2520
agccggtcga gattcgaggg aagactgtht athththcagta ctctaatacgc catgagattg	2580
tcaacaatca gagtctgga gaggtccctg gcaatgtcct attggtcacc ththgaaggag	2640
ththcaatctca ccatgtctgc atcgatgtca ththcatctggt atgtgaatat tcagctthacc	2700
ththcaactatt gththctththt atagtgattt thththctththt ththcagtaga ththtaatacta	2760
tgaaaatatt tcaactththt gthththththgc aaactthththt tgagtgtatt ththththcagth	2820
tattgththga catacagtht gthththththt attgthththt acagthththt tgacgtththt	2880
gaaaatgctc gaatcacaga ththththththgc ththththththt aathththththt gagagagththt	2940
ggaaaatagth ththcatgththt ththththththt ggacaggtgt cactctgcac ththththththt	3000
aththctththth ththththththt aathththththt ththththththt gathththththt cctththththt	3060
tatcaaththt ctccactgtht ththththththt atgactcata ththththththt actththththt	3120
caggthththth ctgctthththt ctthththththt aathththththt ctthththththt agctgctggt	3180
ththcaggththt gagataththt gththththththt caaggthththt cctthththththt aathththththt	3240
gatgthththaa ctcatcatct gccgtcataa cctgctcagg cactthththt gthththththt	3300
gtggacactg cctththththt aaggactgct ctggatgtht gaagthththt cactthththt	3360
caaatcttht athththththt ththththththt gataaagctc ththththththt ththththththt	3420
ththththththt aaththththt ththththththt gaacatgtht gctcatgcaa ththththththt	3480

ES 2 788 128 T3

```

tcttactcag cccacactga tctaaatatc aaatttcagt cccaccgcag caggtagagt      3540
tttgagtccg cgcaaatgtg ccattccatt gttttactgc tcctactgtt ggaagcctta      3600
tggttgaata gttgattcat gtgttttgat tttctgacgt actcaggac tacacaaatc      3660
catatcttcc ggtgaatcaa actgctatgg atggttctat gcaggtaa atttcctctt      3720
tctagtctat ctccaacagc ttagacaatt cttacattga atgcgttact gattgtcttt      3780
gacgtcattg cattcagcct gctttgggtg ctgatggaaa gagggtagaa actcagagca      3840
acgtcctact tgctttgatt gagaatatgc aatacgtgtg cacacggtga ggaacaccat      3900
tatgcacgtt tctgcatctc agcatccttt catttctcaa aattaattat ttcctttgct      3960
tgtcataggt gttttccgct tatgggactg tgcagaagat tgcaatattt gagaaaaatg      4020
gttcaacgca agccttaatt caatactctg gtacatgacc ttgatgatct gaatacatat      4080
attattatac tatacttctt tcggttatat ggcgaatcat cttatgtgta tgctaagaat      4140
ttgaatagtc atcatttgct tcatgttccg ttttcttgat tcttctgtag acataccaac      4200
ggcgacaata gcgaaagaag cattggaggg aactgcata tatgacggga ggctactgta      4260
agcttcgact aacatactcg tcatactgat ctcaatgtaa aggtacgtaa gatcagttgc      4320
tttcttgatt tgtgcaccca aacaaaaaag cttggggaaa gagaataata acttatgtct      4380
gcaagaacca tatgctattt ttttctctt caacaattgt atgaaatctg aattcgactt      4440
tctagtttat tcaactagtg attttctgct ttcttctctc aggcatttag cgacaaaagc      4500
ggagactaca cactgcctga tctaagccaa ctggtgggcc aaaagggtcc aggagtggcc      4560
gctgctagtg ggccaacaga ttgttgccac aatgggcagg tgcagactca atacacaaga      4620
agttcatata tgtaccact gtaagcaaag gtactagatt ttgataaagc gcgagtttat      4680
ttttaatttt ttttcaattg acaaatattt agtaaatgtc atattttcat atatttgtgt      4740
tttattttat aaaagactta aactttttat ctttatttat cgtattttat tttaaatgac      4800
tatttatgtt taaaaaatta aactttattt ctttaatgaa ttaagttgat ataactctga      4860
taaattaatt ttattatgtg gttaatat tttaaaaa aaattatata cttttaataa      4920
agatttgtat ttttcaatga aaaaattcaa ttttttttat gaatgcttaa attatattaa      4980
gaaaagaaaa ga      4992
<210> 7
<211> 448
<212> PRT
<213> Brassica oleracea
<400> 7
Met Ala Ala Ala Ala Met Ala Val His Leu Pro Lys His Ser Ser Phe
1          5          10          15

```

ES 2 788 128 T3

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

ES 2 788 128 T3

260	265	270
Gly Leu Ala Val Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Gln Val Pro Asp Asp		
275	280	285
Pro Val Val Asp Thr Pro Asn Thr Arg Gln Lys Gly Trp Glu Arg Met		
290	295	300
Val Leu Gln Ile Leu Phe Leu Gly Pro Ser Asn Leu Leu Glu Pro Asn		
305	310	315
Ala Ser Phe Ala Gln Met Ser Gln Lys Leu Ile Val Ser Pro Ile Val		
	325	330
		335
Lys Thr Leu Val Phe Ser Lys Val Pro Glu Lys Val Arg Asp Trp Ile		
	340	345
		350
Asp Glu Ile Ala Ser Asp Trp Arg Phe Lys Arg Ile Ile Pro Ala His		
	355	360
		365
Phe Glu Ala Pro Val Asn Ala Gly Arg Ser Glu Phe Leu Ala Ala Phe		
370	375	380
Gly Phe Leu Asp Asp Leu Leu Gly Glu Arg Tyr Val Asn Arg Pro Pro		
385	390	395
		400
Ser Leu Ser Val Leu Phe Thr Ser Leu Met Gly Lys Ala Ala Ser Tyr		
	405	410
		415
Phe Pro Pro Asp Asp Met Arg Thr Leu Ser Ser Leu Asp Gln Phe Leu		
	420	425
		430
Val Ser Val Gly Ala Val Lys Lys Thr Val Ser Gly Arg Lys Arg Arg		
	435	440
		445
<210> 8		
<211> 395		
<212> PRT		
<213> Brassica oleracea		
<400> 8		
Met Ala Ser Ser Gln Phe Arg Tyr Thr Gln Thr Pro Ser Lys Val Val		
1	5	10
		15
His Leu Arg Asn Leu Pro Trp Glu Cys Val Glu Glu Glu Leu Ile Asp		
	20	25
		30
Leu Cys Lys Arg Phe Gly Lys Ile Val Asn Thr Lys Thr Asn Val Gly		

ES 2 788 128 T3

35					40					45					
Ala	Asn	Arg	Asn	Gln	Ala	Phe	Val	Glu	Phe	Gly	Asp	Val	Asn	Gln	Ala
50					55					60					
Ile	Ser	Met	Val	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	Ala	Gln	Ile
65					70					75					80
Arg	Gly	Lys	Thr	Val	Tyr	Ile	Gln	Tyr	Ser	Asn	Arg	His	Glu	Ile	Val
			85						90					95	
Asn	Asn	Gln	Ser	Pro	Gly	Glu	Val	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Leu	Val	Thr
			100					105					110		
Phe	Glu	Gly	Val	Gln	Ser	His	His	Val	Cys	Ile	Asp	Val	Ile	His	Leu
		115					120					125			
Val	Phe	Ser	Ala	Tyr	Gly	Phe	Val	His	Lys	Ile	Ala	Thr	Phe	Glu	Lys
	130					135					140				
Ala	Ala	Gly	Phe	Gln	Ala	Leu	Val	Gln	Phe	Thr	Asp	Val	Asp	Thr	Ala
145					150					155					160
Leu	Ala	Ala	Arg	Thr	Ala	Leu	Asp	Gly	Arg	Ser	Ile	Pro	Lys	Tyr	Leu
			165						170					175	
Leu	Pro	Glu	His	Val	Gly	Ser	Cys	Asn	Leu	Arg	Met	Ser	Tyr	Ser	Ala
			180					185					190		
His	Thr	Asp	Leu	Asn	Ile	Lys	Phe	Gln	Ser	His	Arg	Ser	Arg	Asp	Tyr
		195					200					205			
Thr	Asn	Pro	Tyr	Leu	Pro	Val	Asn	Gln	Thr	Ala	Met	Asp	Gly	Ser	Met
	210					215					220				
Gln	Pro	Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Lys	Arg	Val	Glu	Thr	Gln	Ser	Asn
225					230					235					240
Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Ile	Glu	Asn	Met	Gln	Tyr	Ala	Val	Thr	Val	Asp
			245						250					255	
Val	Leu	His	Thr	Val	Phe	Ser	Ala	Tyr	Gly	Thr	Val	Gln	Lys	Ile	Ala
			260					265					270		
Ile	Phe	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Thr	Gln	Ala	Leu	Ile	Gln	Tyr	Ser	Asp
		275					280					285			

ES 2 788 128 T3

Ile Ser Thr Ala Thr Met Ala Lys Glu Ala Leu Glu Gly His Cys Ile
290 295 300

Tyr Asp Gly Gly Tyr Cys Lys Leu Arg Leu Thr Tyr Ser Arg His Thr
305 310 315 320

Asp Leu Asn Val Lys Ala Phe Ser Asp Lys Ser Arg Asp Tyr Thr Leu
325 330 335

Pro Asp Leu Ser Gln Leu Val Gly Gln Lys Val Pro Gly Val Ala Ala
340 345 350

Ala Ser Gly Pro Thr Asp Gly Trp Pro Asn Gly Gln Val Gln Thr Gln
355 360 365

Tyr Met Gly Ser Ser Tyr Met Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Thr Gly Ala
370 375 380

Ser Pro Ser Ser Gly His Pro Pro Tyr Tyr Gly
385 390 395

<210> 9

<211> 448

<212> PRT

<213> Brassica oleracea

<400> 9

Met Ala Ala Ala Ala Met Ala Val His Leu Pro Lys His Ser Ser Phe
1 5 10 15

Leu Thr Lys Pro Lys His Pro Ser Asp Gln Asn Ser Asn Phe Leu Gly
20 25 30

Gly Ser Leu Lys Phe Gly Arg Ser Met Ser Leu Asn Arg Lys Thr Lys
35 40 45

Gly Pro Val Met Val Ser Ala Ala Ser Thr Val Glu Gly Asp Arg Ser
50 55 60

Lys Gln Phe Tyr Ile Asn Phe Thr Gly Phe Pro Phe Pro Leu Gly Pro
65 70 75 80

Phe Leu Asn Arg Arg Thr Ile Arg Thr Glu Ala Val Lys Gly Ser Ile
85 90 95

Trp Met Phe Glu Gln Glu Gln Ala Leu Gly Phe Ser Ser Val Ser Thr
100 105 110

ES 2 788 128 T3

Asn Ile Arg Met Thr Val Ile Lys Leu Lys Ser Gly Gly Leu Trp Val
 115 120 125
 His Ala Pro Ile Ala Pro Thr Lys Glu Cys Ile Gln Leu Ile Glu Glu
 130 135 140
 Leu Gly Ala Pro Val Glu Tyr Ile Val Leu Pro Thr Phe Ala Tyr Glu
 145 150 155 160
 His Lys Ile Phe Val Gly Pro Phe Ser Arg Lys Phe Pro Lys Ala Gln
 165 170 175
 Val Trp Val Ala Pro Arg Gln Trp Ser Trp Pro Leu Asn Leu Pro Leu
 180 185 190
 Glu Phe Phe Gly Ile Phe Arg Ala Lys Thr Ile Lys Asp Gly Asp Leu
 195 200 205
 Ser Thr Pro Trp Ala Asp Glu Ile Glu Gln Lys Val Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Glu Val Gly Ile Gly Pro Tyr Val Glu Val Ala Phe Tyr His Lys Arg
 225 230 235 240
 Ser Arg Thr Leu Leu Val Thr Asp Ala Val Ile Phe Val Pro Lys Lys
 245 250 255
 Pro Pro Ser Ser Ile Ser Ser Glu Ser Leu Leu Ala Ser Ala Lys Asn
 260 265 270
 Gly Leu Ala Val Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Gln Val Pro Asn Asp
 275 280 285
 Pro Val Val Asp Thr Pro Asn Thr Arg Gln Lys Gly Trp Glu Arg Met
 290 295 300
 Val Leu Gln Ile Leu Phe Leu Gly Pro Ser Asn Leu Leu Glu Pro Asn
 305 310 315 320
 Ala Ser Phe Ala Gln Met Ser Gln Lys Leu Ile Val Ser Pro Ile Val
 325 330 335
 Lys Thr Leu Val Phe Ser Lys Val Pro Glu Lys Val Arg Asp Trp Ile
 340 345 350
 Asp Glu Ile Ala Ser Asp Trp Arg Phe Lys Arg Ile Ile Pro Ala His
 355 360 365

ES 2 788 128 T3

Phe Glu Ala Pro Ile Asn Ala Gly Arg Ser Glu Phe Leu Ala Ala Phe
370 375 380

Gly Phe Leu Asp Asp Leu Leu Gly Glu Arg Tyr Val Asn Arg Pro Pro
385 390 395 400

Ser Leu Ser Val Leu Phe Thr Ser Leu Met Gly Lys Ala Ala Ser Tyr
405 410 415

Phe Pro Pro Asp Asp Met Arg Thr Leu Ser Ser Leu Asp Gln Phe Leu
420 425 430

Val Ser Val Gly Ala Val Lys Lys Thr Val Ser Gly Arg Lys Arg Arg
435 440 445

<210> 10

<211> 395

<212> PRT

<213> Brassica oleracea

<400> 10

Met Ala Ser Ser Gln Phe Arg Tyr Thr Gln Thr Pro Ser Lys Val Val
1 5 10 15

His Leu Arg Asn Leu Pro Trp Glu Cys Val Glu Glu Glu Leu Ile Asp
20 25 30

Leu Cys Lys Arg Phe Gly Lys Ile Val Asn Thr Lys Thr Asn Val Gly
35 40 45

Ala Asn Arg Asn Gln Ala Phe Val Glu Phe Gly Asp Val Asn Gln Ala
50 55 60

Ile Ser Met Val Ser Tyr Tyr Ala Ser Ser Ser Glu Pro Ala Gln Ile
65 70 75 80

Arg Gly Lys Thr Val Tyr Ile Gln Tyr Ser Asn Arg His Glu Ile Val
85 90 95

Asn Asn Gln Ser Pro Gly Glu Val Pro Gly Asn Val Leu Leu Val Thr
100 105 110

Phe Glu Gly Val Gln Ser His His Val Cys Ile Asp Val Ile His Leu
115 120 125

Val Phe Ser Ala Tyr Gly Phe Val His Lys Ile Ala Thr Phe Glu Lys
130 135 140

ES 2 788 128 T3

```

Ala Ala Gly Phe Gln Ala Leu Val Gln Phe Thr Asp Val Asp Thr Ala
145                      150                      155                      160

Leu Ala Ala Arg Thr Ala Leu Asp Gly Arg Ser Ile Pro Lys Tyr Leu
                      165                      170                      175

Leu Pro Glu His Val Gly Ser Cys Asn Leu Arg Met Ser Tyr Ser Ala
                      180                      185                      190

His Thr Asp Leu Asn Ile Lys Phe Gln Ser His Arg Ser Arg Asp Tyr
195                      200                      205

Thr Asn Pro Tyr Leu Pro Val Asn Gln Thr Ala Met Asp Gly Ser Met
210                      215                      220

Gln Pro Ala Leu Gly Ala Asp Gly Lys Arg Val Glu Thr Gln Ser Asn
225                      230                      235                      240

Val Leu Leu Ala Leu Ile Glu Asn Met Gln Tyr Ala Val Thr Val Asp
245                      250                      255

Val Leu His Thr Val Phe Ser Ala Tyr Gly Thr Val Gln Lys Ile Ala
260                      265                      270

Ile Phe Glu Lys Asn Gly Ser Thr Gln Ala Leu Ile Gln Tyr Ser Asp
275                      280                      285

Ile Ser Thr Ala Thr Met Ala Lys Glu Ala Leu Glu Gly His Cys Ile
290                      295                      300

Tyr Asp Gly Gly Tyr Cys Lys Leu Arg Leu Thr Tyr Ser Arg His Thr
305                      310                      315                      320

Asp Leu Asn Val Lys Ala Phe Ser Asp Lys Ser Arg Asp Tyr Thr Leu
325                      330                      335

Pro Asp Leu Ser Gln Leu Val Gly Gln Lys Val Pro Gly Val Ala Ala
340                      345                      350

Ala Ser Gly Pro Thr Asp Gly Trp Pro Asn Gly Gln Val Gln Thr Gln
355                      360                      365

Tyr Met Gly Ser Ser Tyr Met Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Thr Gly Ala
370                      375                      380

Ser Pro Ser Ser Gly His Pro Pro Tyr Tyr Gly
385                      390                      395
<210> 11
<211> 326
<212> PRT
<213> Brassica oleracea
<400> 11

```

ES 2 788 128 T3

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

ES 2 788 128 T3

Met Gln Val Phe Ser Ala Tyr Gly Thr Val Gln Lys Ile Ala Ile Phe
225 230 235 240

Glu Lys Asn Gly Ser Thr Gln Ala Leu Ile Gln Tyr Ser Asp Ile Pro
245 250 255

Thr Ala Thr Ile Ala Lys Glu Ala Leu Glu Gly His Cys Ile Tyr Asp
260 265 270

Gly Arg Leu Leu Asp Lys Ser Gly Asp Tyr Thr Leu Pro Asp Leu Ser
275 280 285

Gln Leu Val Gly Gln Lys Val Pro Gly Val Ala Ala Ala Ser Gly Pro
290 295 300

Thr Asp Cys Trp His Asn Gly Gln Val Gln Thr Gln Tyr Thr Arg Ser
305 310 315 320

Ser Tyr Met Tyr Pro Leu
325

<210> 12

<211> 326

<212> PRT

<213> Brassica oleracea

<400> 12

Met Ala Ser Ser Ser Gln Phe Arg Tyr Thr Gln Thr Pro Ser Lys Val
1 5 10 15

Val His Leu Arg Asn Leu Pro Trp Glu Cys Val Glu Glu Glu Leu Ile
20 25 30

Asp Leu Cys Lys Arg Phe Gly Lys Ile Val Asn Thr Lys Thr Asn Val
35 40 45

Gly Ala Asn Arg Asn Gln Ala Phe Val Glu Phe Gly Asp Val Asn Gln
50 55 60

Ala Ile Ser Met Val Ser Tyr Tyr Ala Ser Ser Ser Glu Pro Ala Gln
65 70 75 80

Ile Arg Gly Lys Thr Val Tyr Ile Gln Tyr Ser Asn Arg His Glu Ile
85 90 95

Val Asn Asn Gln Ser Pro Gly Glu Val Pro Gly Asn Val Leu Leu Val
100 105 110

ES 2 788 128 T3

Thr Phe Glu Gly Val Gln Ser His His Val Cys Ile Asp Val Ile His
115 120 125

Leu Val Phe Ser Ala Tyr Gly Phe Val His Lys Ile Ala Thr Phe Glu
130 135 140

Lys Ala Ala Gly Phe Gln Ala Leu Val Gln Phe Thr Asp Val Asp Thr
145 150 155 160

Ala Leu Ala Ala Arg Thr Ala Leu Asp Gly Arg Ser Ile Pro Thr Tyr
165 170 175

Leu Leu Pro Glu His Val Gly Ser Cys Asn Leu Arg Met Ser Tyr Ser
180 185 190

Ala His Thr Asp Leu Asn Ile Lys Phe Gln Ser His Arg Ser Arg Asp
195 200 205

Tyr Thr Asn Pro Tyr Leu Pro Val Asn Gln Thr Ala Met Asp Gly Ser
210 215 220

Met Gln Val Phe Ser Ala Tyr Gly Thr Val Gln Lys Ile Ala Ile Phe
225 230 235 240

Glu Lys Asn Gly Ser Thr Gln Ala Leu Ile Gln Tyr Ser Asp Ile Pro
245 250 255

Thr Ala Thr Ile Ala Lys Glu Ala Leu Glu Gly His Cys Ile Tyr Asp
260 265 270

Gly Arg Leu Leu Asp Lys Ser Gly Asp Tyr Thr Leu Pro Asp Leu Ser
275 280 285

Gln Leu Val Gly Gln Lys Val Pro Gly Val Ala Ala Ala Ser Gly Pro
290 295 300

Thr Asp Cys Trp His Asn Gly Gln Val Gln Thr Gln Tyr Thr Arg Ser
305 310 315 320

Ser Tyr Met Tyr Pro Leu
325

<210> 13

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo de At3g01190

<400> 13

ttctccacg actgcttcg 19

<210> 14

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador inverso de At3g01190

<400> 14

ctaacaaaac tgatccgtca c 21

<210> 15

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo de At3g02420
 <400> 15
 gttgcgttgc catctgcag 19
 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso de At3g02420
 <400> 16
 caggctgaga tagccattgg 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo de At3g07130
 <400> 17
 ctactaacca tggagttacc 20
 <210> 18
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso de At3g07130
 <400> 18
 aacgctggtg ggattcac 18

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido, particularmente un polinucleótido aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en
 - 5 a. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 3 (GD33 versión de BolC.VG1.a);
 - b. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos cuya hebra complementaria hibrida con la molécula de ácido nucleico de a);
 - 10 c. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se desvía de la secuencia de nucleótidos definida en a) o b) por la degeneración del código genético;

en el que dicha molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de a) – c), tras la expresión en una planta de *Brassica* o parte de la planta, da lugar a un vigor aumentado de las semillas en comparación con una planta de *Brassica* o parte de la planta que no comprende dicha molécula de ácido nucleico.
2. Un polinucleótido, particularmente un polinucleótido aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en
 - 15 a. molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3;
 - b. molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3;
 - 20 c. molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3;
 - d. molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos cuya hebra complementaria hibrida con la molécula de ácido nucleico de cualquiera de a) – c);
 - 25 e. molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se desvía de la secuencia de nucleótidos definida en cualquiera de a) – d) por la degeneración del código genético;

en el que dicha molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de a) – e), tras la expresión en una planta de *Brassica* o parte de la planta, da lugar a un vigor aumentado de las semillas en comparación con una planta de *Brassica* o parte de la planta que no comprende dicha molécula de ácido nucleico.
3. Un polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en el que el fenotipo de vigor aumentado de las semillas se caracteriza por un fenotipo adicional seleccionado del grupo que comprende: velocidad aumentada de germinación, velocidad aumentada de brote de plántulas, uniformidad aumentada de germinación de las semillas, uniformidad aumentada de brote de plántulas, porcentaje aumentado de germinación de las semillas, tolerancia aumentada de la semillas frente al entorno externo y/o condiciones maternas, sensibilidad aumentada a ABA o contenido modificado de ABA.
- 35 4. Un método para aumentar el vigor de las semillas, que comprende introducir, mediante técnicas de transformación de plantas en una planta de *Brassica* o parte de la planta, un polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha planta de *Brassica* tiene vigor aumentado de las semillas en comparación con una planta de *Brassica* o parte de la planta que no comprende dicho polinucleótido.
- 40 5. Un método para seleccionar una planta de *Brassica* o parte de la planta con vigor aumentado de las semillas, que comprende la detección, en la planta de *Brassica* o parte de la planta a ensayar, de la presencia o ausencia de un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la presencia de dicho polinucleótido indica que la planta de *Brassica* o parte de la planta tiene vigor aumentado de las semillas en comparación con una planta de *Brassica* o parte de la planta en que dicho polinucleótido está ausente.
- 45 6. Uso del polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para modificar el vigor de las semillas de una planta de *Brassica*.

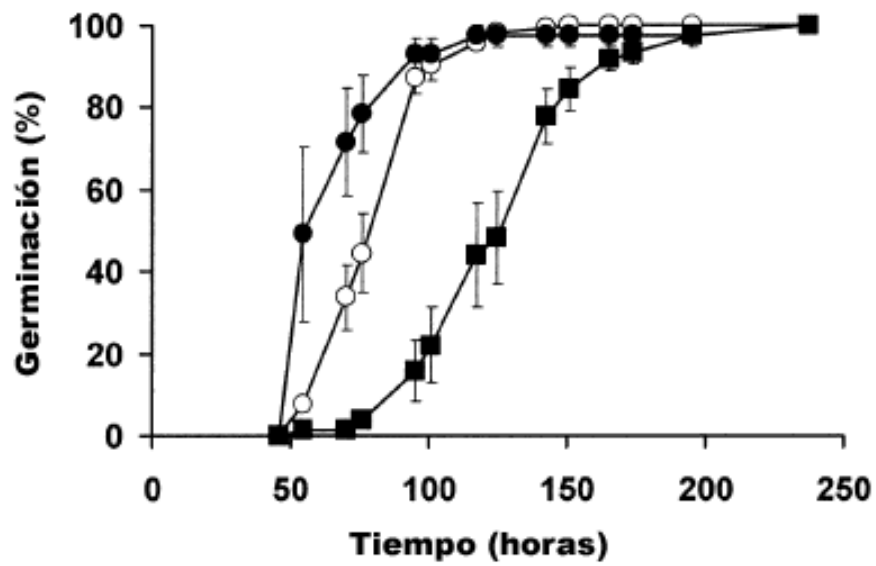


Fig. 1

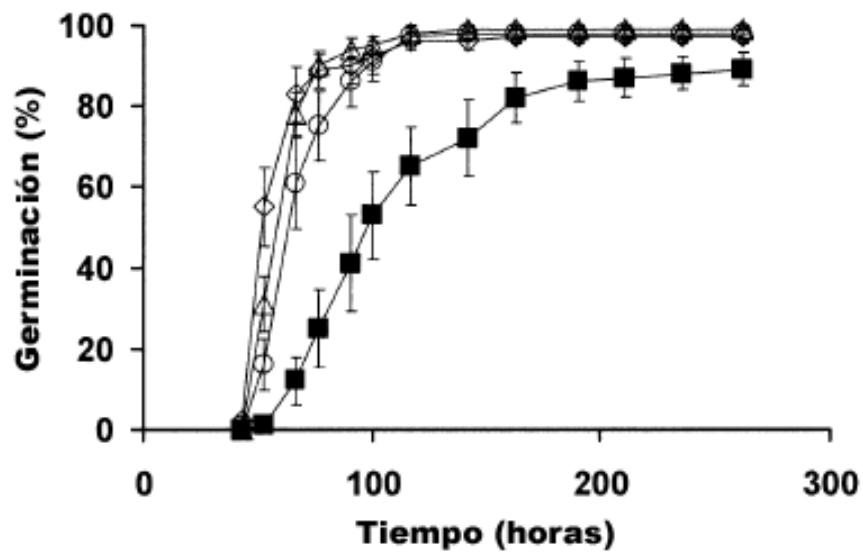


Fig. 2

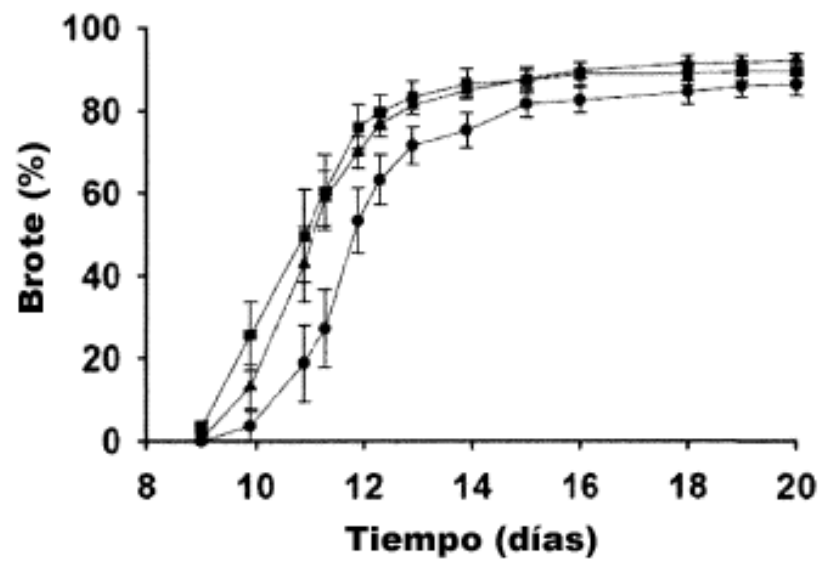


Fig. 3

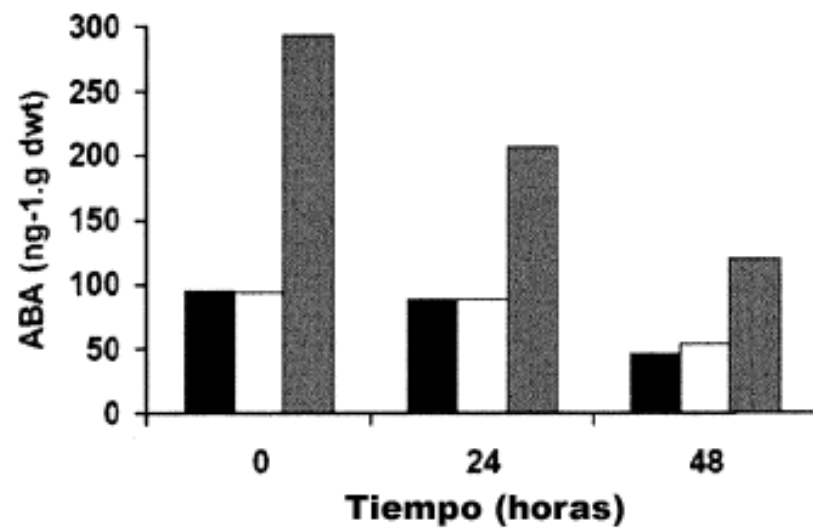


Fig. 4

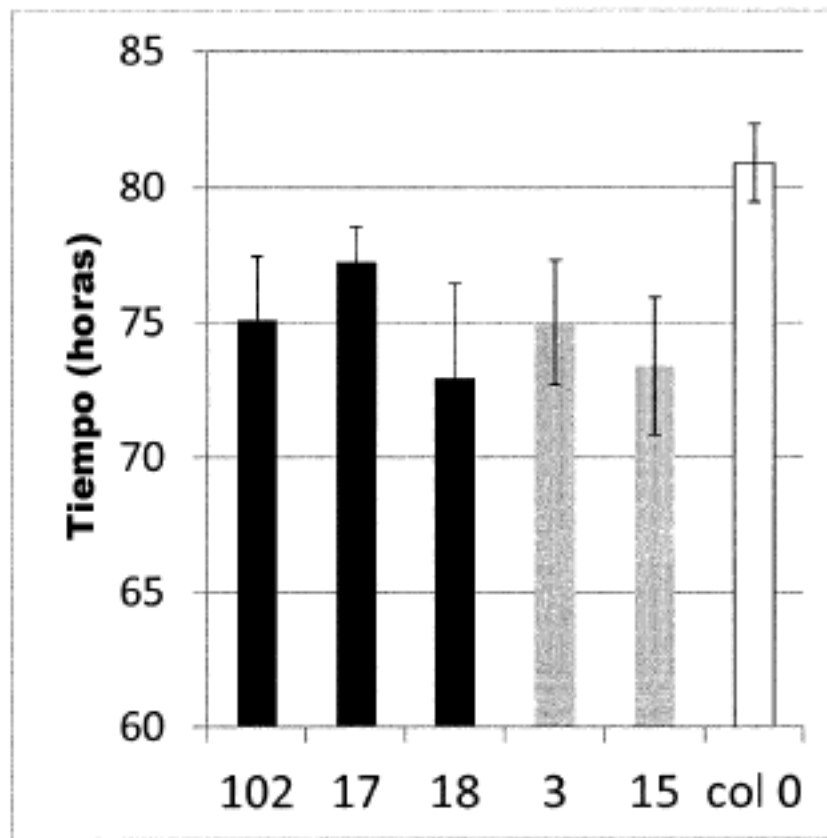


Fig. 5

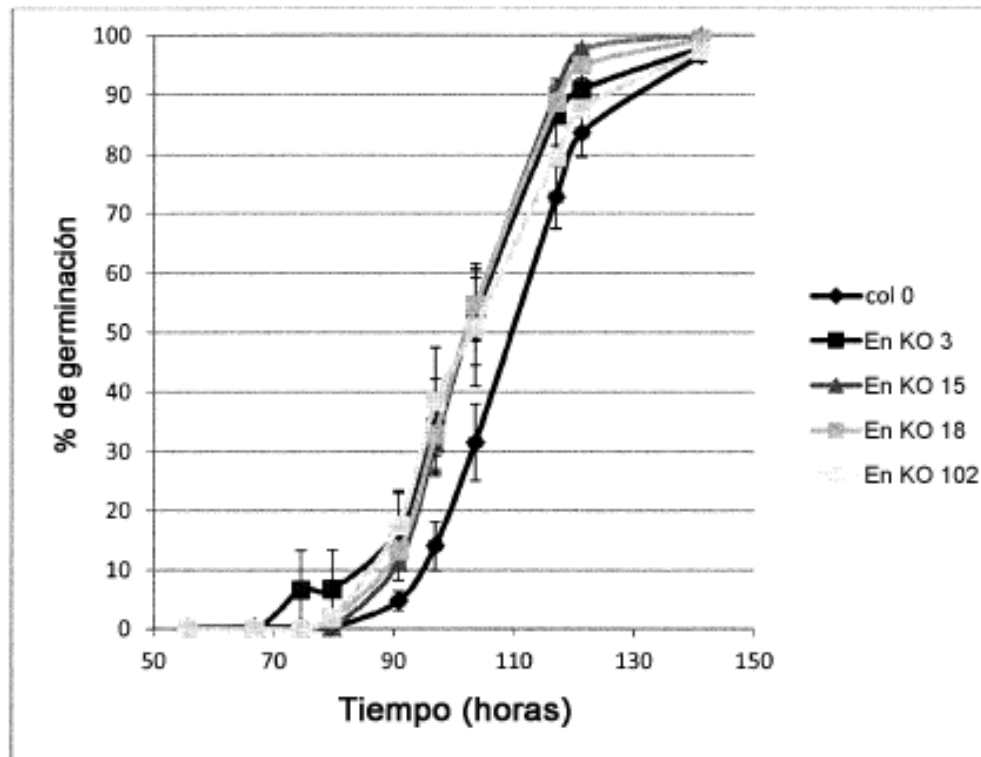


Fig. 6