

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 849**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2013** **E 13184378 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020** **EP 2708607**

54 Título: **Marcadores genéticos para *Myb28***

30 Prioridad:

13.09.2012 US 201261700731 P

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

29.03.2021

73 Titular/es:

SEMINIS VEGETABLE SEEDS, INC. (50.0%)
800 N. Lindbergh Blvd.
St. Louis MO 63167, US y
PLANT BIOSCIENCE LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

MITHEN, RICHARD F;
TRAKA, MARIA y
BRUGMANS, BART W

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 814 849 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

Marcadores genéticos para *Myb28*

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la identificación de marcadores moleculares unidos estrechamente con el locus *Myb28* del factor de transcripción que confiere niveles aumentados de glucosinolato y a métodos para producir plantas de hortalizas de crucíferas con niveles aumentados de glucosinolatos.

10

Antecedentes de la invención

Las plantas de hortalizas crucíferas (tales como las plantas de *Brassica*, como el brócoli) acumulan 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (glucorafanina) y 3-metilsulfinilbutil glucosinolato (glucoiberina). Estos glucosinolatos se hidrolizan a isotiocianatos. Los estudios epidemiológicos correlacionan las dietas ricas en hortalizas crucíferas con una reducción del riesgo de cáncer. Se han desarrollado hortalizas crucíferas de contenido elevado de glucosinolatos (por ejemplo, brócoli de contenido elevado de glucosinolatos) como se describe en los documentos WO99/52345, Mithen *et al.* (2003) Theor Appl Genet 106:727-734 y PCT/GB2009/001648.

15

La producción de glucosinolatos en plantas de hortalizas crucíferas es compleja, como puede verse en el mapa de flujo del azufre en plantas mostrado en la Fig. 4. Antes de la presente invención, se utilizaban marcadores metabólicos o moleculares de *metilialquilmalato sintasa (MAM)* en programas de mejora vegetal. Se sabía que *MAM1* y *MAM3* se asociaban estrechamente con rasgos de glucosinolatos elevados.

20

Sorprendentemente, los presentes inventores observaron que algunos cultivares de *Brassica* con fenotipo de glucosinolatos elevados (por ejemplo, glucorafanina) no poseían los alelos del marcador MAM aunque estuvieran asociados con el rasgo, concluyendo por tanto que los marcadores MAM no estaban necesariamente estrechamente unidos o que la clave del perfil de glucosinolatos elevados y por tanto su utilización como marcadores en mejora vegetal no era fiable para el rastreo de este rasgo.

25

30

Por tanto, los inventores buscaron un marcador para glucosinolatos elevados que pudiera ser fiable y utilizado sistemáticamente para determinar el genotipo de una planta con un nivel aumentado de glucosinolato.

30

Sumario de la invención

35

La invención se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Un hallazgo fundamental de la presente invención es que el locus *Myb28* del factor de transcripción es un locus clave en la producción de niveles aumentados de glucosinolatos, particularmente de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (glucorafanina) y 3-metilsulfinilbutil glucosinolato (glucoiberina) en plantas de hortalizas crucíferas (tales como las plantas de *Brassica*, por ejemplo, el brócoli). Por primera vez, los presentes inventores han mostrado que se pueden observar polimorfismos en el locus *Myb 28* del factor de transcripción entre plantas de hortalizas crucíferas con elevado contenido de glucosinolato (por ejemplo, *Brassica villosa*) y plantas de hortalizas crucíferas que no muestran el fenotipo de glucosinolato elevado (por ejemplo, *Brassica oleracea*) y que estos polimorfismos pueden utilizarse como marcadores moleculares para determinar el genotipo de una planta de hortaliza crucífera (como una planta *Brassica*, por ejemplo, el brócoli) para niveles de glucosinolato modificados (por ejemplo, aumentados) y/o en mejora vegetal asistida por marcadores para plantas con niveles de glucosinolato modificados (por ejemplo, aumentados).

40

45

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para determinar si el genotipo de una planta de hortaliza crucífera se asocia con un nivel aumentado de glucosinolato, que comprende obtener una muestra de ácidos nucleicos de dicha planta o una porción de la misma y detectar en dichos ácidos nucleicos un polimorfismo en el locus *Myb28* que está unido genéticamente a un nivel aumentado de glucosinolato, en donde el polimorfismo y el locus *Myb28* que confieren un rasgo de glucosinolato aumentado están genéticamente unidos y exhiben una puntuación LOD mayor de 3,0.

50

55

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método para producir una planta de hortaliza crucífera que tiene niveles aumentados de glucosinolato mediados por *Myb28*, transformando una planta de hortaliza crucífera con un gen *myb28* que comprende la SEQ ID NO: 1 excepto por al menos un polimorfismo seleccionado del grupo que consiste en:

60

a) un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP; del inglés, single nucleotide polymorphism) en una posición que corresponde al nucleótido 83, 136, 226, 563, 610, 830, 995, 1116, 1513, 1577, 1606, 1620, 1825, 1863, 1877 o 2026 de la SEQ ID NO: 1 o

65

b) un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1, o

c) un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 836 y 837, entre los nucleótidos 867 y 868 o entre los nucleótidos 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1.

5 Los presentes inventores describen en el presente documento una planta de hortaliza crucifera que tiene niveles aumentados de glucosinolato mediados por *Myb28* o parte de la misma, producida por un método que comprende seleccionar plantas de primera descendencia que comprenden un polimorfismo en el locus *Myb28* que está genéticamente unido a niveles aumentados de glucosinolato.

10 Los presentes inventores muestran en el presente documento una semilla de una planta producida mediante un método de la presente invención.

15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO:23.

20 En otro aspecto, la presente invención a) un solo cebador o sonda que amplifica y/o hibrida con al menos un polimorfismo en una posición que corresponde al nucleótido 83, 136, 226, 563, 610, 830, 995, 1116, 1513, 1577, 1606, 1620, 1825, 1863, 1877 o 2026 de la SEQ ID NO: 1; o que amplifica y/o hibrida con un polimorfismo presente entre posiciones que corresponden a los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1; o que amplifica y/o hibrida con un polimorfismo presente entre los nucleótidos 836 y 837, entre los nucleótidos 867 y 868 o entre los nucleótidos 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1.

25 En ciertas realizaciones, la etapa de detección o selección comprende PCR y/o hibridación de ADN.

En algunas realizaciones, la determinación del genotipo comprende un ensayo codominante.

30 En una realización, el método de cribado comprende la detección de un marcador genético codominante.

En una realización el polimorfismo comprende al menos uno de:

- 35 a. un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en una posición correspondiente al nucleótido 83, 136, 226, 563, 610, 830, 995, 1116, 1513, 1577, 1606, 1620, 1825, 1863, 1877 o 2026 de la SEQ ID NO: 1 o
- b. un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1, o
- 40 c. un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 836 y 837, entre los nucleótidos 867 y 868 o entre los nucleótidos 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1.

45 En una realización, el polimorfismo comprende al menos uno de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en una posición correspondiente al nucleótido 83, 136, 226, 563, 610, 830, 995, 1116, 1513, 1577, 1606, 1620, 1825, 1863, 1877 o 2026 de la SEQ ID NO: 1 o de la misma.

50 En otra realización el polimorfismo comprende una deleción de uno o más de los nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1.

55 En otra realización, el polimorfismo comprende una deleción de uno o más de los nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1.

60 En otra realización, el polimorfismo comprende una deleción de tres o más de los nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1.

65 En otra realización, el polimorfismo comprende una deleción de cuatro o más (por ejemplo, 5 o más, 6 o más o 7 o más) de los nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1.

En otra realización, el polimorfismo comprende una deleción de ocho o más de los nucleótidos presentes entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1.

En otra realización, el polimorfismo comprende una deleción de todos los nucleótidos presentes entre los nucleótidos

323 y 332 o todos los nucleótidos entre los nucleótidos 521 y 524 o todos los nucleótidos entre los nucleótidos 783 y 786 o todos los nucleótidos entre los nucleótidos 909 y 914 o todos los nucleótidos entre los nucleótidos 1365 y 1369 o todos los nucleótidos entre 1811 y 1821 o todos los nucleótidos entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1.

5 En otra realización, el polimorfismo comprende una delección de al menos uno de los nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332 o al menos uno de los nucleótidos entre los nucleótidos 521 y 524 o al menos uno de los nucleótidos entre los nucleótidos 783 y 786 o en al menos uno de los nucleótidos entre los nucleótidos 909 y 914 o al menos uno de los nucleótidos entre los nucleótidos 1365 y 1369 o al menos uno de los nucleótidos entre 1811 y 1821 o al menos uno de los nucleótidos entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1 o combinaciones de los mismos.

15 En una realización adicional, el polimorfismo comprende una delección de al menos un nucleótido en una posición correspondiente al nucleótido 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 522, 523, 784, 785, 910, 911, 912, 913, 1366, 1367, 1368, 1812, 1813, 1814, 1815, 1816, 1817, 1818, 1819, 1820, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054 o 2055 de la SEQ ID NO: 1.

20 En una realización, el polimorfismo comprende una delección de los nucleótidos en las siguientes posiciones: 324-331, 522-523, 784-785, 910-913, 1366-1368, 1812-1820 o 2047-2055 de la SEQ ID NO: 1 o combinaciones de los mismos.

En una realización, el polimorfismo comprende una inserción de uno o más nucleótidos entre los nucleótidos 836 y 837, 867 y 868 o 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1.

25 Cuando el polimorfismo es una inserción de uno o más nucleótidos entre los nucleótidos 836 y 837, a continuación, convenientemente la inserción es de dos nucleótidos. Cuando se insertan dos nucleótidos entre los nucleótidos 836 y 837, a continuación, convenientemente los nucleótidos pueden ser TT.

30 Cuando el polimorfismo es una inserción de uno o más nucleótidos entre los nucleótidos 867 y 868, a continuación, convenientemente la inserción es de un nucleótido. Cuando se insertan un nucleótido entre los nucleótidos 867 y 868, a continuación, convenientemente el nucleótido puede ser A.

35 Cuando el polimorfismo es una inserción de uno o más nucleótidos entre los nucleótidos 943 y 944, a continuación, convenientemente la inserción es de hasta e incluyendo 13 nucleótidos. Cuando se insertan 13 nucleótidos entre los nucleótidos 943 y 944, a continuación, convenientemente los nucleótidos pueden ser TATTA AAAAAGTA (SEQ ID NO:25).

40 En algunas realizaciones, el polimorfismo es más de uno (convenientemente más de 2, convenientemente más de 3, convenientemente más de 4, convenientemente más de 5, convenientemente todos) de los siguientes polimorfismos:

- a. un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en una posición correspondiente al nucleótido 83, 136, 226, 563, 610, 830, 995, 1116, 1513, 1577, 1606, 1620, 1825, 1863, 1877 o 2026 de la SEQ ID NO: 1 o
- b. un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1, o
- c. un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 836 y 837, entre los nucleótidos 867 y 868 o entre los nucleótidos 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1.

50 En realizaciones particulares, el polimorfismo se detecta mediante un método de cribado que comprende la utilización de al menos una primera secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO:23.

55 Los presentes inventores describen en el presente documento un método para producir una planta de hortaliza crucífera que comprende las etapas de: (a) cruzar una planta de hortaliza crucífera que tiene un nivel aumentado de glucosinolato con una segunda hortaliza crucífera; y (b) seleccionar al menos una planta de hortaliza crucífera de primera descendencia que comprende un polimorfismo en el locus *Myb28* que está genéticamente unido a niveles aumentados de glucosinolato.

60 Seleccionar la primera descendencia puede comprender seleccionar la descendencia basándose en la presencia de uno o más marcadores genéticos de la segunda planta de hortaliza crucífera genéticamente unida a al menos un primer rasgo adicional. El rasgo adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en: rendimiento, resistencia a enfermedades, vigor de la emergencia, vigor vegetativo, tolerancia al estrés, altura de la planta, calidad de la inflorescencia, diámetro de la inflorescencia, peso de la inflorescencia, tamaño de la inflorescencia, forma de la inflorescencia, color de la inflorescencia y número de días hasta la floración.

- 5 Los presentes inventores describen en el presente documento un método para producir una planta de hortaliza crucífera que tiene niveles aumentados de glucosinolatos mediados por *Myb28*, que puede también comprender la etapa de (c) cruzar la planta de la descendencia consigo misma o con una tercera planta para producir una planta de la descendencia de una generación posterior y puede también comprender las etapas de: (d) cruzar la planta de la descendencia de una generación posterior consigo misma o con una segunda planta; y (e) repetir las etapas (c) y (d) durante unas 3-10 generaciones adicionales para producir una planta de hortaliza crucífera endogámica que comprende un nivel aumentado de glucosinolatos, en donde la planta de la descendencia de al menos una generación posterior se criba en función de la presencia de un polimorfismo en el locus *Myb28* genéticamente unido a la producción de glucosinolatos. La planta de la descendencia de una generación posterior puede seleccionarse para el cruzamiento basándose en la presencia de glucosinolatos y un rasgo deseado. En el método, la etapa (e) se repite con suficiente endogamia como para obtener una planta de hortaliza crucífera endogámica que comprende un rasgo de glucosinolatos aumentado y de otro modo comprende los rasgos agronómicos de la segunda planta de brócoli.
- 10
- 15 En realizaciones particulares, los métodos de la presente invención pueden también comprender ensayar el fenotipo de una planta de brócoli para determinar un nivel aumentado de glucosinolatos.
- 20 En una realización preferida de la presente invención, el glucosinolatos es 4-metilsulfínibutil glucosinolatos (MSB).
- 25 En una realización preferida, la planta de hortaliza crucífera (por ejemplo, una planta de *Brassica*, tal como el brócoli) comprende al menos un glucosinolatos en una cantidad de al menos 10 micromol/g de peso seco.
- 30 En una realización, la planta de hortaliza crucífera comprende 4-metilsulfínibutil glucosinolatos (MSB), 3-metilsulfínipropil glucosinolatos (MSP) o combinaciones de los mismos en una cantidad de al menos 10 micromol/g de peso seco.
- 35 En una realización, la expresión "planta de hortaliza crucífera con un nivel aumentado de glucosinolatos" significa una planta de hortaliza crucífera que comprende 4-metilsulfínibutil glucosinolatos (MSB), 3-metilsulfínipropil glucosinolatos (MSP) o combinaciones de los mismos en una cantidad de al menos 10 micromol/g de peso seco.
- 40 En una realización, la planta de hortaliza crucífera para utilizar en un método o producirla mediante un método de acuerdo con la presente invención es una planta *Brassica*.
- 45 En una realización, la planta de hortaliza crucífera para utilizar en un método o producirla mediante un método de acuerdo con la presente invención es el brócoli.
- 50 En todavía otro aspecto, la invención proporciona un método que comprende la etapa de almacenar el resultado de la etapa de detección del polimorfismo en un medio legible por ordenador, en donde el genotipo de una planta o población de plantas para al menos un primer polimorfismo detectado de acuerdo con la invención a invención se almacena en un medio legible por ordenador.
- 55 En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un método que comprende adicionalmente: recolectar las porciones comestibles (por ejemplo, inflorescencias) producidas por la planta.
- Los presentes inventores describen en el presente documento un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de al menos 18 nucleótidos contiguos que están conservados entre SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 24 cuando se alinean.
- 60 Los presentes inventores describen en el presente documento un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de al menos 18 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 1, en donde la secuencia no está presente dentro de la SEQ ID NO: 24.
- 65 Los presentes inventores describen en el presente documento un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de al menos 18 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 24, en donde la secuencia no está presente dentro de la SEQ ID NO: 1.
- Para evitar toda duda, toda la numeración de las posiciones de nucleótidos como se utiliza en el presente documento se corresponde con la numeración de nucleótidos dada en la SEQ ID NO: 1 o por alineación con SEQ ID

NO: 1.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Fig. 1 muestra una alineación de secuencias entre una secuencia consenso del locus *Myb28* para el brócoli, por ejemplo, *B. villosa*, con un nivel aumentado de glucosinolato (FT69) y una secuencia consenso del locus *Myb28* para brócoli, por ejemplo, *B. oleracea*, que no tiene un nivel aumentado de glucosinolato (Oleracea). Se detectan un total de 26 polimorfismos de característica única (SFP; del inglés, single feature polymorphisms) (de los cuales hay 16 SNP y 10 indeles) en una secuencia con una longitud total de 2202 pb. Los SFP están sombreados en la alineación de secuencias mostrada en la Fig. 1. Estos SFP son indicativos de la introgresión de *B. villosa*.
- 10 La Fig. 2a muestra la SEQ ID NO: 1; una secuencia de un fragmento de ácido nucleico que comprende el locus *Myb28* de *Brassica oleracea* (brócoli) que no tiene niveles aumentados de glucosinolato. Los SFP (incluidos los SNP y los indeles, por ejemplo, los nucleótidos que se pueden suprimir) están sombreados. Los nucleótidos entre los que se puede insertar una SFP (inserción indel) están subrayados.
- 15 La Fig. 2b muestra la SEQ ID NO: 2; una secuencia de un fragmento de ácido nucleico que comprende el locus *Myb28* de *Brassica oleracea* (brócoli) que no tiene niveles aumentados de glucosinolato. Los SFP (incluidos los SNP y los indeles, por ejemplo, los nucleótidos que se pueden suprimir) están sombreados. Los fragmentos entre paréntesis <> (y nucleótidos en minúscula) corresponden a SFP (indeles, que son inserciones) en la secuencia de *Brassica oleracea*, cuyas inserciones se encuentran en el brócoli de glucosinolatos elevados (por ejemplo, *Brassica villosa*).
- 20 La Fig. 3 muestra la expresión de *Myb28* en hojas de cultivares de brócoli (los cultivares 1199, 1639 y HG1, siendo todos cultivares de glucosinolato elevado (por ejemplo, cultivares de glucorafanina elevada)).
- 25 La Fig. 4 muestra un esquema del flujo de azufre en plantas de *Brassica*. Los metabolitos en amarillo son los principales grupos de S.
- La Fig. 5 muestra la SEQ ID NO: 24; una secuencia de un fragmento de ácido nucleico que comprende el locus *Myb28* de *Brassica villosa* FT69 (brócoli) que tiene niveles de glucosinolato aumentados. Los nucleótidos sombreados indican SFP (incluidos SNP e indeles) cuando se alinean con la SEQ ID NO: 1.
- 30 La Fig. 6 muestra datos de un ensayo TaqMan (TM) diseñado para *Myb28* en *Brassica* que valida la eficacia del marcador en el rastreo del fenotipo en un panel de germoplasma.

Divulgación detallada de las realizaciones preferidas de la invención

35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la materia a la cual pertenece la presente divulgación. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20ª Ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994) y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, Nueva York (1991) proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos usados en la presente divulgación.

40 Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior salvo que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo también se desvela específicamente. Cada intervalo menor entre cualquier valor indicado o valor intermedio en un intervalo indicado y cualquier otro valor indicado o intermedio en dicho intervalo, está abarcado dentro de esta divulgación.

45 Los epígrafes proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta divulgación que se pueden tener por referencia a la especificación en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen totalmente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

50 Pueden aparecer otras definiciones de términos a lo largo de la memoria descriptiva. Antes de describir las realizaciones ejemplares en mayor detalle, ha de comprenderse que la presente divulgación no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante, dado que el alcance de la presente divulgación estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

60 Cabe destacar que, como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

65 Las publicaciones citadas en el presente documento, se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo mencionado en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que tales publicaciones constituyen la técnica anterior a las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a la identificación de un locus *Myb28*polimórfico, amplificable y ensayable, un gen

de factor de transcripción estrechamente vinculado a la conferencia de niveles aumentados de glucosinolato en plantas. Este locus polimórfico puede denominarse el locus "*Myb28* FT69" o locus "FT69" o locus "*Brassica villosa*". Uno o más marcadores genéticos en este locus, tales como polimorfismos de ADN, por ejemplo, uno o más polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o una inserción/delección ("indel") se pueden utilizar por tanto como marcador(es) genético(s) para detectar la presencia del locus del rasgo de contenido elevado de glucosinolato.

El locus polimórfico puede definirse como que comprende un alelo que está genéticamente unido e identifica a un fenotipo de niveles aumentados de glucosinolato o un alelo que está genéticamente unido e identifica a un fenotipo de ausencia de niveles aumentados de glucosinolato.

Por tanto, la invención proporciona haplotipos moleculares específicos en el locus *Myb28* que se asocian con la presencia o ausencia de un alelo génico de nivel aumentado de glucosinolato.

En una realización, una secuencia de *Myb28* - FT69 (glucosinolato aumentado) se representa como la secuencia de FT69 mostrada en la Fig. 1.

En otra realización, una secuencia de *Myb28* - FT69 (glucosinolato aumentado) se representa como la secuencia de FT69 mostrada en la SEQ ID NO: 24 (en la Fig. 5).

La línea FT-69 es una línea desarrollada por el John Innes Center, Reino Unido, que tiene niveles elevados de 3-metiltiopropil glucosinolato (MSP) (glucoiberina). Fue creado cruzando un pariente silvestre del brócoli domesticado, *Brassica villosa*, con un brócoli domesticado, *Brassica oleracea*. FT-69 se retrocruzó con la línea de plantas de brócoli adaptada BRM 51-19. Después de cada cruce, las plantas se seleccionaron basándose en similitudes fenotípicas con el BRM 51-19 parental recurrente y se analizaron los niveles de MSP y el fitoquímico adicional 4-metilsulfiniilbutil glucosinolato (MSB) (glucorafanina). La línea terminada se denominó BRM 51-1162.

Los inventores determinaron que el brócoli (*Brassica oleracea*) aporta los genes para producir el glucosinolato diana, por ejemplo, el 4-metilsulfiniilbutil glucosinolato (MSB) (glucorafanina) y la *B. villosa* contribuyen con los genes para aumentar la concentración del glucosinolato diana.

La presente invención permite por tanto la utilización de sitios polimórficos en el locus *Myb28* para seleccionar eficazmente plantas con niveles aumentados de glucosinolato, incluso bajo una presión de selección elevada para otros rasgos, tales como rendimiento, resistencia a enfermedades, vigor de la emergencia, vigor vegetativo, tolerancia al estrés, altura de la planta, calidad de la inflorescencia, diámetro de la inflorescencia, peso de la inflorescencia, tamaño de la inflorescencia, forma de la inflorescencia, color de la inflorescencia y número de días hasta la floración, entre otros.

Los presentes inventores describen en el presente documento cebadores de PCR y condiciones de reacción en las que un marcador, tal como un SNP o indel específico para plantas, que comprende niveles aumentados de glucosinolatos, pueden detectarse de forma dominante o codominante. A través de la utilización de los marcadores, un experto en la materia puede seleccionar un nivel aumentado de un glucosinolato durante la mejora vegetal de una planta de hortaliza crucífera (por ejemplo, una planta de *Brassica*, como el brócoli).

Los marcadores descritos anteriormente unidos al rasgo de contenido elevado de glucosinolatos no proporcionan una herramienta de selección adecuada porque, por ejemplo, los marcadores descritos anteriormente no están estrechamente unidos a niveles aumentados de glucosinolato.

Los presentes inventores describen en el presente documento un método para introducir niveles aumentados de glucosinolato en una planta de hortaliza crucífera (por ejemplo, una planta de *Brassica*, tal como el brócoli), que comprende: (a) cruzar una planta de hortaliza crucífera que tiene un nivel aumentado de glucosinolato con una segunda hortaliza crucífera formar una población segregante; y (b) seleccionar al menos un miembro de la población que exhibe un rasgo de glucosinolato aumentado, en donde la selección se basa en la presencia de un haplotipo detectable en el locus *Myb28*-FT69. La línea de pimiento que tiene el rasgo de glucosinolato aumentado se puede cruzar con la segunda línea de plantas de hortalizas crucíferas (por ejemplo, una planta de *Brassica*, como el brócoli) durante al menos dos generaciones (por ejemplo, creando una población F2 o BC1S1). Se pueden identificar las plantas por tener un fenotipo de glucosinolato aumentado antes del cruce. En un aspecto, la población segregante se autofecunda y la población subsiguiente se criba para niveles aumentados de glucosinolato.

Como se utiliza en el presente documento, un "marcador" es un indicador de la presencia de al menos un fenotipo, genotipo o polimorfismo. Los marcadores incluyen, aunque no de forma limitativa, polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), secuencias polimórficas amplificadas escindibles (CAPS; del inglés, cleavable amplified polymorphic sequences), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP; del inglés, amplified fragment length polymorphisms), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP; del inglés, restriction fragment length polymorphisms), repeticiones de secuencia simple (SSR; del inglés, simple sequence repeats), inserción(ones)/delección(ones) (INDEL(es)), repeticiones de secuencias inter simples (ISSR; del inglés, inter-simple sequence repeats), marcadores de región amplificada caracterizada por secuencia (SCAR; del inglés, sequence

characterized amplified region) y secuencias de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD; del inglés, random amplified polymorphic DNA).

5 Un marcador puede heredarse de forma codominante (ambos alelos en un locus en un heterocigótico diploide son fácilmente detectables), sin componente de variación ambiental, es decir, heredabilidad de 1.

Un "marcador de ácido nucleico" como se utiliza en el presente documento significa una molécula de ácido nucleico que es capaz de ser un marcador para detectar un polimorfismo, fenotipo o ambos, asociados con un nivel aumentado de glucosinolato.

10 La utilización de un marcador en el locus *Myb28* proporciona un cribado molecular rápido y fiable de líneas candidatas y permite el cribado genotípico de líneas de mejora vegetal de hortalizas crucíferas (por ejemplo, una planta de *Brassica*, como el brócoli) para un nivel elevado de glucosinolato sin la necesidad de un ensayo fitoquímico fenotípico.

15 Una vez que se producen plantas que tienen niveles aumentados de glucosinolato, las propias plantas pueden cultivarse de acuerdo con procedimientos convencionales. La descendencia puede obtenerse mediante reproducción sexual. Las semillas resultantes de la reproducción sexual se pueden recuperar de plantas que tienen niveles aumentados de glucosinolato y se pueden plantar o cultivar de otro modo como medio de propagación. La descendencia también puede obtenerse de plantas a través de reproducción asexual. El protoplasto o propágulos (por ejemplo, esquejes, vástagos o rizomas) se pueden recuperar de plantas con un nivel aumentado de glucosinolato o de partes de las mismas y se pueden emplear para propagar plantas con un nivel aumentado de glucosinolato.

20 Los presentes inventores describen en el presente documento, una descendencia de plantas que tienen un nivel aumentado de glucosinolato, producidas por los métodos actualmente descritos. Como se utiliza en el presente documento, la descendencia incluye no solo, sin limitación, los productos de cualquier cruzamiento (ya sea un retrocruzamiento o de otro tipo) entre dos plantas, sino toda la descendencia cuyo linaje se remonta al cruzamiento original. En un aspecto de la presente invención, la descendencia contiene aproximadamente un 50 %, 25 %, 12,5 % o menos de ADN nuclear de una planta que tiene un nivel aumentado de glucosinolato y expresa el material genético que proporciona un nivel aumentado de glucosinolato.

25 Como se utiliza en el presente documento, el enlace de dos secuencias de ácido nucleico, que incluyen una secuencia marcadora de ácido nucleico y una secuencia de ácido nucleico de un locus genético que confiere un rasgo deseado, tal como niveles aumentados de glucosinolato, puede ser genético o físico o ambos.

30 En un aspecto de la invención, el marcador de ácido nucleico y el locus genético que confieren un rasgo de glucosinolato aumentado están unidos genéticamente, por ejemplo, exhibiendo una puntuación LOD superior a 2,0, a juzgar por el mapeo por intervalos para el rasgo de glucosinolato aumentado basado en los métodos de máxima probabilidad descritos por Lander y Botstein, 1989 (*Genetics* 121: 185-199) e implementados en el paquete de software MAPMAKER (por ejemplo, Lander *et al.*, (1987) *Genomics* 1: 174-181; parámetros predeterminados). En otras realizaciones, el marcador y la región que confieren un rasgo de glucosinolato aumentado están genéticamente unidos y exhiben una puntuación LOD superior a 3,0 o una puntuación LOD superior a 6,0, 9,0, 12,0, 15,0 o 18,0.

35 En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico puede estar unida físicamente al locus *Myb28*. En algunos aspectos, el marcador de ácido nucleico se hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que está dentro del locus *Myb28*.

40 Como se utiliza en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridar entre sí en caso de que las dos moléculas sean capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenaria antiparalela. Las condiciones de rigurosidad convencionales se describen por Sambrook *et al.* (1989) (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) y por Haymes *et al.* (1985) (*Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, Distrito de Columbia). Las desviaciones respecto de la complementariedad completa son por tanto permisibles, en tanto que dichas desviaciones no impidan por completo la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Por tanto, para que una molécula de ácido nucleico sirva como un cebador o sonda, solo es necesario que sea lo suficientemente complementaria en la secuencia para que tenga la capacidad de formar una estructura bicatenaria estable en las concentraciones particulares de disolventes y sal empleadas.

45 Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, 6,0 * cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido por un lavado de 2,0 * SSC a 50 °C, se conocen por los expertos en la materia o se pueden encontrar en Ausubel *et al.* (1989) (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Nueva York), Sección 6.3.1-6.3.6. En algunas realizaciones, las condiciones de hibridación pueden ser condiciones de rigurosidad alta, moderada o baja. Las condiciones ejemplares incluyen aquellas que utilizan formamida al 50%, 5,0 * SSC, 1 % SDS e incubación a 42 °C durante 14 horas, seguido por un lavado utilizando 0,2 * SSC, 1 % SDS e incubación a 65 °C.

La especificidad de la hibridación puede verse afectada por los lavados posteriores a la hibridación. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado puede seleccionarse de una rigurosidad baja de aproximadamente 2,0 * SSC a 50 °C a una rigurosidad moderada de aproximadamente 1,0 * SSC a 50 °C a una rigurosidad elevada de aproximadamente 0,2 * SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, a condiciones de rigurosidad moderada a aproximadamente 50 °C, a condiciones de rigurosidad alta a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura o la concentración de sal puede variar, como pueden mantenerse constantes la temperatura o la concentración de sal mientras se cambia la otra variable. En algunos aspectos, la etapa de lavado se puede realizar durante 5, 10, 15, 20, 25, 30 o más minutos. En otro aspecto, la etapa de lavado se realiza durante aproximadamente 20 minutos. En todavía otro aspecto, la etapa de lavado se puede repetir 1, 2, 3, 4 o más veces utilizando la concentración de sal, la temperatura y el tiempo seleccionados. En otro aspecto, la etapa de lavado se repite dos veces.

Un perfil de marcador genético de una planta puede resultar predictivo de los rasgos agronómicos de un híbrido producido utilizando esa endogamia. Por ejemplo, si una planta endogámica de perfil de marcador genético y fenotipo conocidos se cruza con una segunda planta endogámica de perfil de marcador genético y fenotipo conocidos, es posible predecir el fenotipo del híbrido F1 basándose en los perfiles de marcadores genéticos combinados de las endogámicas parentales. Los métodos para la predicción del rendimiento híbrido a partir de datos de marcadores genéticos se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.492.547. Tales predicciones se pueden hacer utilizando cualquier marcador genético adecuado, por ejemplo, SSR, indeles, RFLP, AFLP, SNP, ISSR o isoenzimas.

Se pueden utilizar marcadores adicionales, tales como SSR, marcadores AFLP, marcadores RFLP, marcadores RAPD, marcadores fenotípicos, SNP, marcadores SCAR, marcadores de isoenzimas o perfiles de transcripción de micromatrices que están genéticamente vinculados o correlacionados con niveles aumentados de glucosinato mediados por Myb28. Se conocen en la técnica métodos para aislar dichos marcadores.

Por ejemplo, los SSR específicos del locus se pueden obtener cribando una biblioteca genómica para marcadores específicos de secuencias encontradas en el clon genómico de *Myb28-FT69*, secuenciando clones "positivos", diseñando cebadores que flanquean las repeticiones y amplificando el ADN genómico con estos cebadores.

Como se utiliza en el presente documento, la descendencia no solo incluye, sin limitación, los productos de cualquier cruzamiento (ya sea un retrocruzamiento o de otro tipo) entre dos plantas, sino toda la descendencia cuyo linaje se remonta al cruzamiento original. Específicamente, sin limitación, tal descendencia incluye plantas que tienen un 50 %, 25 %, 12,5 % o menos de ADN nuclear derivado de una de las dos plantas cruzadas originariamente.

Como se utiliza en el presente documento, una segunda planta se deriva de una primera planta si el linaje de la segunda planta incluye la primera planta.

Los presentes inventores describen en el presente documento un complemento genético de las líneas de hortalizas crucíferas (por ejemplo, *Brassica*, tal como el brócoli) descritas en el presente documento. Se proporciona adicionalmente un complemento genético híbrido, en donde el complemento se forma mediante la combinación de un complemento genético haploide a partir de unas líneas de hortalizas crucíferas endogámicas de élite (por ejemplo, *Brassica*, tal como el brócoli) descritas en el presente documento y otro complemento genético haploide. Los medios para determinar dicho complemento genético son bien conocidos en la técnica.

Como se utiliza en el presente documento, La expresión "complemento genético" significa un agregado de secuencias de nucleótidos, cuya expresión define el fenotipo de una planta, tal como una planta de brócoli o una célula o tejido de esa planta. A modo de ejemplo, se genotipa una planta de brócoli para determinar una muestra representativa de los marcadores heredados que posee. Los marcadores se pueden heredar de manera codominante, de modo que la presencia de ambos alelos en un locus diploide es detectable fácilmente y están libres de variación ambiental, es decir, su heredabilidad es cercana o igual a 1. Este genotipado se realiza preferiblemente en al menos una generación de la planta descendiente para la que también se determina el valor numérico del rasgo o rasgos de interés. La matriz de genotipos de locus único se expresa como un perfil de alelos marcadores, dos en cada locus para una planta diploide. La composición alélica del marcador de cada locus puede ser homocigota o heterocigota. La homocigosis es una condición en la que ambos alelos en un locus se caracterizan por las mismas condiciones del genoma en un locus (por ejemplo, la misma secuencia de nucleótidos). La heterocigosis se refiere a diferentes condiciones del genoma en un locus. Potencialmente, se podría utilizar cualquier tipo de marcador genético, por ejemplo, repeticiones de secuencia simple (SSR), inserción/delección (INDEL), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) e isoenzimas.

Se puede obtener información genética considerable a partir de una población F2 clasificada completamente, utilizando un sistema de marcadores codominantes (por ejemplo, Mather, 1938 Measurements of Linkage in Heredity: Meuthuen and Co). Una población F2 es la primera generación de polinización autógama o geitonógama

después de que se produce la semilla híbrida. Normalmente, una sola planta F1 se poliniza de forma autógena o geitonógama para generar una población que se segrega por los genes codificados en el núcleo de una manera mendeliana (1:2:1).

- 5 En contraste con la utilización de marcadores codominantes, la utilización de marcadores dominantes a menudo requiere pruebas de descendencia (por ejemplo, F3 o familias autógenas retrocruzadas) para identificar individuos heterocigóticos. La información recopilada puede ser equivalente a la obtenida en una población F2 completamente clasificada. La selección asistida por marcadores se puede aplicar a continuación a la descendencia subsiguiente basada en asociaciones del mapa de rasgos del marcador (F2, F3), en donde el enlace no se ha disociado
10 completamente por eventos de recombinación (es decir, desequilibrio máximo).

15 Las líneas endogámicas recombinantes (RIL; del inglés, Recombinant inbred lines) (líneas genéticamente relacionadas; normalmente >F5) se pueden utilizar como una población de mapeo. Los RIL se pueden desarrollar autofecundando plantas F2, a continuación, autofecundando las plantas F3 resultantes y repitiendo este proceso generacional de autofecundación, aumentando de este modo la homocigosis. La información obtenida de los marcadores dominantes se puede maximizar mediante la utilización de RIL porque todos los loci son homocigotos o casi homocigotos. En condiciones de enlace estrecho (es decir, aproximadamente recombinación <10%), los marcadores dominantes y codominantes evaluados en poblaciones de RIL proporcionan más información por individuo que cualquier tipo de marcador en poblaciones de retrocruzamiento (por ejemplo, Reiter *et al.*, 1992 (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 1477-1481). Sin embargo, a medida que la distancia entre los marcadores se hace más grande (es decir, los loci se vuelven más independientes), la información en las poblaciones de RIL disminuye drásticamente en comparación con los marcadores codominantes.

25 Las poblaciones retrocruzadas se pueden utilizar para el mapeo de poblaciones. Se puede crear una población de retrocruzamiento (BC; del inglés, backcross population) mediante el cruce de una F1 con uno de sus parentales. Típicamente, las poblaciones de retrocruzamientos se crean para recuperar los rasgos deseables (que pueden incluir la mayoría de los genes) a partir de una línea parental recurrente (el parental que se emplea en los retrocruzamientos), en tanto que se añaden uno o unos pocos rasgos de la segunda línea parental, que es a menudo se conoce como el donante. Se puede hacer una serie de retrocruzamientos al padre recurrente para recuperar la mayoría de los rasgos parentales recurrentes deseables. Por tanto, se crea una población que consiste en individuos casi como el parental recurrente, en donde cada individuo porta cantidades variables o un mosaico de regiones genómicas del parental donante. Las poblaciones de retrocruzamientos pueden ser útiles para mapear marcadores dominantes, particularmente si todos los loci en el parental recurrente son homocigotos y el donante y el parental recurrente tienen alelos de marcadores polimórficos que contrastan (Reiter *et al.*, 1992).
30

35 La información obtenida de poblaciones de retrocruzamiento utilizando marcadores codominantes o dominantes es menor que la obtenida de poblaciones F2 completamente clasificadas, porque los eventos de recombinación que involucran un gameto, en lugar de dos, se muestrean por planta. Las poblaciones de retrocruzamiento, sin embargo, son más informativas (con una saturación de marcador baja) en comparación con los RIL, ya que la distancia entre los loci unidos aumenta en las poblaciones de RIL (es decir, aproximadamente un 15% de recombinación). El aumento de recombinación puede ser beneficioso para la resolución de enlaces estrechos, pero puede ser indeseable en la construcción de mapas con saturación de marcadores baja.
40

45 Las líneas casi isogénicas (NIL; del inglés, Near-isogenic lines) creadas por muchos retrocruzamientos para producir una matriz de individuos que son casi idénticos en composición genética, excepto por el rasgo o la región genómica en cuestión, pueden utilizarse como una población de mapeo. En el mapeo con NIL, solo una parte de los loci son polimórficos entre las líneas parentales y se esperaría que se segregaran en la población NIL altamente homocigótica. Esos loci que son polimórficos en una población NIL, sin embargo, es probable que estén unidos con el rasgo de interés.
50

55 Las plantas generadas, utilizando un método de la presente invención, se pueden utilizar como parte de un programa de mejora vegetal. La elección del método de mejora vegetal depende del modo de reproducción de la planta, la heredabilidad de los rasgos que se mejoran y el tipo de cultivo utilizado comercialmente (por ejemplo, cultivar híbrido F1, cultivar de línea pura, etc.). A continuación, se exponen enfoques seleccionados, no limitantes para la mejora vegetal de las plantas de la presente invención. Un programa de mejora vegetal se puede mejorar utilizando la selección asistida por marcadores de la descendencia de cualquier cruzamiento. Se entiende además que cualquier cultivar comercial y no comercial puede utilizarse en un programa de mejora vegetal. Factores tales como, por ejemplo, rendimiento, resistencia a enfermedades, aparición, vigor, vigor vegetativo, tolerancia al estrés, altura de la planta, calidad de la inflorescencia, diámetro de la inflorescencia, peso de la inflorescencia, tamaño de la inflorescencia, forma de la inflorescencia, color de la inflorescencia y número de días hasta la floración, habitualmente dictarán la elección.
60

65 Para los rasgos altamente heredables, una elección de plantas individuales superiores evaluadas en un solo lugar será efectiva, si bien para rasgos con baja heredabilidad, la selección debe basarse en análisis estadísticos (por ejemplo, valores promedios) obtenidos de evaluaciones replicadas de familias de plantas relacionadas. Los métodos de selección populares comúnmente incluyen la selección de linaje, la selección de linaje modificada, la selección

masiva y la selección recurrente. En una realización preferida se lleva a cabo un programa de retrocruzamiento o de mejora vegetal recurrente.

La complejidad de la herencia influye en la elección del método de mejora vegetal. La mejora vegetal por retrocruzamiento se puede utilizar para transferir uno o unos pocos genes favorables para un rasgo altamente heredable a un cultivar deseable. Se utilizan diversas técnicas de selección recurrente para mejorar cuantitativamente los rasgos heredados, controlados por numerosos genes. La utilización de selección recurrente en cultivos autógamos depende de la facilidad de polinización, la frecuencia de los híbridos exitosos de cada polinización y del número de descendientes híbridos de cada cruce exitoso.

Las líneas de reproducción se pueden probar y comparar con los estándares apropiados en entornos representativos del(las) área(s) comercial(es) diana durante dos o más generaciones. Las mejores líneas son candidatas como parentales para nuevos cultivares comerciales; aquellos que todavía tienen deficiencias en los rasgos pueden utilizarse como parentales para híbridos o para producir nuevas poblaciones para una selección adicional.

Un método para identificar una planta superior es observar su rendimiento en relación con otras plantas experimentales y con un cultivar estándar crecido ampliamente. Si una sola observación no es concluyente, las observaciones replicadas pueden proporcionar una mejor estimación de su valor genético. Un obtentor puede seleccionar y cruzar dos o más líneas parentales, seguido de polinizaciones autógamas y geitonógamas y selecciones repetidas, produciendo muchas combinaciones genéticas nuevas.

El desarrollo de nuevas líneas de hortalizas crucíferas (por ejemplo, *Brassica*, como el brócoli) requiere el desarrollo y la selección de variedades de hortalizas crucíferas (por ejemplo, *Brassica*, como el brócoli), el cruce de estas variedades y la selección de cruces híbridos superiores. La semilla híbrida se puede producir mediante cruces manuales entre parentales fértiles masculinos seleccionados o mediante la utilización de sistemas de esterilidad masculina. Los híbridos se pueden seleccionar para ciertos rasgos de un solo gen. Los datos adicionales sobre las líneas parentales, así como el fenotipo del híbrido, influyen en la decisión del obtentor respecto a continuar con el cruce de híbrido específico.

Se pueden utilizar métodos de mejora vegetal del linaje y de mejora vegetal de selección recurrente para desarrollar cultivares a partir de poblaciones de mejora vegetal. Los programas de mejora vegetal combinan rasgos deseables de dos o más cultivares o de diversas fuentes generalizadas en grupos de mejora vegetal, a partir de los que se desarrollan cultivares mediante autofecundación y selección de fenotipos deseados en líneas parentales. Estas líneas se utilizan para producir nuevos cultivares. Se pueden evaluar nuevos cultivares para determinar cuáles tienen potencial comercial.

La mejora vegetal del linaje se utiliza comúnmente para la mejora de los cultivos autógamos. Se cruzan dos parentales que poseen rasgos favorables complementarios para producir una F1. Una población F2 se produce autofecundando una o varias F1. Se realiza la selección de los mejores individuos en las mejores familias. Las pruebas replicadas de familias pueden comenzar en la generación F4 para mejorar la eficacia de la selección de rasgos con baja heredabilidad. En una etapa avanzada de endogamia (es decir, F6 y F7), las mejores líneas o mezclas de líneas fenotípicamente similares se ensayan para un lanzamiento como cultivares nuevos.

La mejora vegetal por retrocruzamientos y la mejora vegetal por cruzamientos se han utilizado para transferir genes para un rasgo simplemente hereditario, altamente hereditario, a un cultivar homocigótico deseable o una línea endogámica, que es el parental recurrente. La fuente del rasgo a ser transferido se denomina donante parental. Se espera que la planta resultante obtenida a partir de un programa de retrocruzamiento exitoso tenga los atributos del parental recurrente (por ejemplo, un cultivar) y el rasgo deseable transferido del parental donante. Después del cruce inicial, los individuos que poseen el fenotipo del parental donante se seleccionan y se cruzan repetidamente (retrocruzan) con el parental recurrente. Después de varias generaciones de retrocruzamiento con selección, se espera que la línea resultante tenga los atributos del parental recurrente (por ejemplo, el cultivar) y el rasgo deseable transferido del parental donante.

Las plantas se pueden generar utilizando un procedimiento de descenso de una sola semilla. El procedimiento de descendencia de una sola semilla, en sentido estricto, se refiere a plantar una población segregante, a continuación, seleccionar una planta en esta y en cada generación posterior para autogamia y crear la siguiente generación. Cuando la población ha avanzado desde la F2 hasta el nivel de endogamia deseado, las plantas de las que se derivan las líneas se rastrea cada una a diferentes individuos F2. El número de plantas en una población disminuye en cada generación debido a que algunas semillas no germinan o a que algunas plantas no producen al menos una semilla. Como resultado, no todas las plantas F2 muestreadas originalmente en la población estarán representadas por una descendencia cuando el avance de generación se completa.

Se pueden encontrar descripciones de otros métodos de mejora vegetal que se utilizan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos en uno de los distintos libros de referencia disponibles (por ejemplo, Fehr, 1987, Principles of Cultivar Development Vol. 1, págs. 2-3).

En otro aspecto, las líneas de hortalizas crucíferas (por ejemplo, *Brassica*, tal como el brócoli) que tienen niveles aumentados de glucosinolatos pueden utilizarse en programas de mejora vegetal para combinar niveles aumentados de glucosinolatos con rasgos adicionales de interés.

5 Como se utiliza en el presente documento, la referencia a una hortaliza crucífera que tiene un nivel aumentado de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un nivel aumentado de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo, se refiere a un brócoli que tiene un nivel aumentado de al menos un fitoquímico seleccionado de una lista que comprende: 4- metilsulfinilbutil glucosinolato, 3-metilsulfinilpropil glucosinolato, 4-metiltiobutil glucosinolato; 3-
10 metiltiopropil glucosinolato, sulforafano, erucina, sativina, iberina, β -isotiocianato de feniletilo (PE-ITC), 3- metiltiopropil isotiocianato.

Las hortalizas crucíferas (por ejemplo, brócoli) que tienen un elevado nivel de glucosinolato se describen en los documentos WO99/52345 y PCT/GB2009/001648.

15 Convenientemente, la hortaliza crucífera con niveles aumentados de glucosinolato (tal como *Brassica* o brócoli con niveles aumentados de glucosinolato) puede comprender niveles aumentados de uno o más glucosinolatos y/o uno o más isotiocianatos.

20 En una realización, la hortaliza crucífera con niveles aumentados de glucosinolato (tal como *Brassica* o brócoli con niveles aumentados de glucosinolato) para su utilización en la presente invención comprende niveles aumentados de uno o más de los siguientes compuestos: 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB), 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP), 4-metiltiobutil glucosinolato; 3-metiltiopropil glucosinolato.

25 En una realización, la hortaliza crucífera con niveles aumentados de glucosinolato (tal como *Brassica* o brócoli con niveles aumentados de glucosinolato) para su utilización en la presente invención o producida mediante un método de acuerdo con la presente invención, comprende niveles aumentados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB) y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP).

30 Preferentemente, la hortaliza crucífera con niveles aumentados de glucosinolato (tal como *Brassica* o brócoli con niveles aumentados de glucosinolato) tiene un nivel de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB) que es de 2 a 3 veces el nivel de 4- metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB) encontrado en una hortaliza crucífera estándar (tal como una *Brassica* estándar o un brócoli estándar) cultivada en condiciones similares.

35 Convenientemente, la hortaliza crucífera con niveles aumentados de glucosinolato (tal como *Brassica* o brócoli con niveles aumentados de glucosinolato) puede tener un nivel de 4-3--metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) que es de 2 a 3 veces el nivel de 4-3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) encontrado en una hortaliza crucífera estándar (tal como una *Brassica* estándar o un brócoli estándar) cultivada en condiciones similares.

40 Convenientemente, la hortaliza crucífera con niveles aumentados de glucosinolato (tal como *Brassica* o brócoli con niveles aumentados de glucosinolato) puede comprender al menos un glucosinolato en una cantidad de al menos 10 micromol/g de peso seco. Más preferentemente, al menos aproximadamente 14 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 16 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 20 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 25 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 30 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 50 μ moles/g de peso seco o al menos aproximadamente 75 μ moles/g de peso seco.
45

Convenientemente, en una realización, la hortaliza crucífera con niveles aumentados de glucosinolato (tal como *Brassica* o brócoli con niveles aumentados de glucosinolato) puede tener 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB) y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) en una cantidad de al menos 10 micromol/g de peso seco. Más preferentemente, al menos aproximadamente 14 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 16 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 20 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 25 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 30 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 50 μ moles/g de peso seco o al menos aproximadamente 75 μ moles/g de peso seco.
50

55 Los glucosinolatos son una clase de compuestos orgánicos que contienen azufre, nitrógeno y un grupo derivado de la glucosa. Se presentan como metabolitos secundarios de muchas plantas del orden Brassicales (especialmente en la familia Brassicaceae), tal como las hortalizas crucíferas.

60 Los glucosinolatos son aniones solubles en agua y pertenecen a los glucósidos. Cada glucosinolato contiene un átomo central de carbono que está unido a través de un átomo de azufre al grupo glicona (formando una cetoxima sulfatada) y a través de un átomo de nitrógeno a un grupo sulfato. Además, el carbono central está unido a un grupo lateral; los diferentes glucosinolatos tienen grupos laterales distintos.

Se sabe que aproximadamente 120 glucosinolatos diferentes se encuentran de forma natural en las plantas.

65 De acuerdo con la presente invención, los glucosinolatos son preferentemente alifáticos.

En la presente invención se prevé que uno o más de los siguientes glucosinolatos pueden ser importantes: 4-metilsulfinilbutil glucosinolato, 3-metilsulfinilpropil glucosinolato, 4-metiltiobutil glucosinolato y 3-metiltiopropil glucosinolato.

5 En una realización, el glucosinolato es preferentemente 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB) y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP).

En una realización el glucosinolato es preferentemente 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB).

10 Se pueden introducir muchos rasgos útiles mediante técnicas de transformación genética. Por tanto, la transformación genética puede utilizarse para insertar un transgén seleccionado en una planta de *Brassica* de la invención o puede, alternativamente, utilizarse para la preparación de transgenes, que pueden introducirse mediante retrocruzamiento. Los métodos para la transformación de plantas, incluyendo *Brassica*, son bien conocidos por los expertos en la materia.

15 Los vectores utilizados para la transformación de células de plantas no están limitados, siempre que el vector pueda expresar un ADN insertado en las células. Por ejemplo, los vectores que comprenden promotores para la expresión de genes constitutivos en células de *Brassica* (por ejemplo, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor) y pueden utilizarse promotores inducibles por estímulos exógenos. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen el vector binario pBI. La "célula de *Brassica*" en la que se va a introducir el vector incluye diversas formas de células de *Brassica*, tales como suspensiones de células cultivadas, protoplastos, secciones de hojas y callos.

20 Puede introducirse un vector en células de *Brassica* mediante métodos conocidos, tales como el método del polietilenglicol, método del policación, electroporación, transferencia *mediada por Agrobacterium*, bombardeo de partículas y captación directa de ADN por los protoplastos.

25 Para llevar a efecto la transformación por electroporación, se pueden emplear tejidos friables, tales como un cultivo en suspensión de células o callo embriogénico o alternativamente, se pueden transformar embriones inmaduros u otro tejido organizado directamente. En esta técnica, se degradarían parcialmente las paredes celulares de las células escogidas exponiéndolas a enzimas que degradaran pectina (pectilasas) o lesionando mecánicamente tejidos de manera controlada.

30 Un método eficaz para suministrar segmentos de ADN transformantes a células de plantas es el bombardeo con microproyectiles. En este método, las partículas se recubren con ácidos nucleicos y se suministran a las células mediante una fuerza propulsora. Las partículas ejemplares incluyen aquellas compuestas de tungsteno, platino y preferentemente oro. Para el bombardeo, las células en suspensión se concentran en filtros o en medio de cultivo sólido. Alternativamente, los embriones inmaduros u otras células diana pueden disponerse en un medio de cultivo sólido. Las células que se van a bombardear se pueden colocar a una distancia adecuada por debajo de la placa de detención de macroproyectiles. Las técnicas de bombardeo con microproyectiles son ampliamente aplicables y pueden utilizarse para transformar virtualmente cualquier especie de planta.

35 La transferencia mediada por *Agrobacterium* es otro sistema ampliamente aplicable para introducir loci de genes en células de plantas. Una ventaja de la técnica es que se puede introducir ADN en tejidos de plantas completos, evitando así la necesidad de regenerar una planta intacta a partir de un protoplasto. Los vectores de transformación de *Agrobacterium* modernos son capaces de replicarse en *E. coli* así como en *Agrobacterium* (y otros Rhizobios), permitiendo las manipulaciones convenientes. Asimismo, los recientes avances tecnológicos en vectores para la transferencia de genes *mediada por Agrobacterium* han mejorado la disposición de los genes y los sitios de restricción en los vectores para facilitar la construcción de vectores capaces de expresar varios genes codificadores de polipéptidos. Los vectores descritos tienen regiones de unión múltiples convenientes flanqueadas por un promotor y un sitio de poliadenilación para la expresión directa de genes codificantes de polipéptidos insertados. Adicionalmente, el *Agrobacterium* que contiene genes Ti armados y desarmados puede utilizarse para la transformación.

40 En aquellas variedades de plantas en donde la transformación *mediada por Agrobacterium* es eficaz, es el método de elección, debido a la naturaleza fácil y definida de la transferencia del locus génico. El uso de vectores que se integran en plantas mediados por *Agrobacterium* para introducir ADN en células de plantas es bien conocido en la técnica (Patente de Estados Unidos n.º 5.563.055). Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.349.124 describe un método para transformar células de plantas utilizando la transformación *mediada por Agrobacterium*. Insertando un gen quimérico que tiene una secuencia de codificación de ADN que codifica la proteína de longitud completa toxina B.t. que expresa una proteína tóxica para las larvas de lepidópteros, esta metodología dio como resultado que las plantas tuvieran resistencia a tales insectos.

45 Varios promotores son de utilidad para la expresión de genes de plantas para cualquier gen de interés, incluidos, aunque no de forma limitativa, a marcadores seleccionables, marcadores puntuables, genes de tolerancia a plagas, resistencia a enfermedades, mejoras nutricionales y cualquier otro gen de interés agronómico. Los ejemplos de promotores constitutivos útiles para la expresión de genes de plantas de *Brassica* incluyen, aunque no de forma

limitativa, el promotor P-35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), que confiere expresión constitutiva de elevado nivel en la mayoría de los tejidos vegetales, incluidas las monocotiledóneas; una versión duplicada en tándem del promotor CaMV 35S, el promotor 35S mejorado (P-e35S), el promotor de nopalina sintasa, el promotor de octopina sintasa; y el promotor del virus del mosaico de la escrofularia (PFMV) como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.378.619 y una versión mejorada del promotor FMV (P-eFMV), en donde la secuencia promotora del P-FMV se duplica en tándem, el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar, un promotor del virus Commelina de mancha amarilla y otros promotores de virus de ADN de plantas que se sabe que se expresan en células de plantas.

Los ácidos nucleicos ejemplares que pueden introducirse en las plantas de esta invención incluyen, por ejemplo, secuencias de ADN o genes de otra especie o incluso genes o secuencias que se originan o están presentes dentro de la misma especie, pero que se incorporan a las células receptoras mediante métodos de ingeniería genética, en lugar de técnicas clásicas de reproducción o mejora vegetal. Sin embargo, el término "exógeno" también tiene por objeto referirse a genes que normalmente no están presentes en la célula que se está transformando o quizás simplemente no está presente en la forma, estructura, etc., como se encuentra en el segmento o gen de ADN transformante o genes que normalmente están presentes y que uno desea expresar de una manera que difiera del patrón de expresión natural, por ejemplo, sobreexpresar. Por tanto, el término gen o ADN "exógeno" tiene por objeto hacer referencia a cualquier gen o segmento de ADN que se introduce en una célula receptora, independientemente de si un gen similar puede estar ya presente en tal célula. El tipo de ADN incluido en el ADN exógeno puede incluir ADN que ya está presente en la célula de la planta, ADN de otra planta, ADN de un organismo diferente o un ADN generado externamente, tal como una secuencia de ADN que contiene un mensaje antisentido de un gen o una secuencia de ADN que codifica una versión sintética o modificada de un gen.

Se conocen muchos cientos, si no miles, de genes diferentes y potencialmente se podrían introducir en una planta de *Brassica* de acuerdo con la invención.

En una realización, el gen *myb28* que tiene uno o más de los polimorfismos enseñados en el presente documento, puede introducirse en una planta de *Brassica* transformando una planta de *Brassica* con dicho gen.

En una realización, la presente invención se refiere a la transformación de una planta de *Brassica* con un gen *myb28* que comprende la SEQ ID NO: 1 excepto por al menos un polimorfismo seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en una posición que corresponde al nucleótido 83, 136, 226, 563, 610, 830, 995, 1116, 1513, 1577, 1606, 1620, 1825, 1863, 1877 o 2026 de la SEQ ID NO: 1 o
- b) un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1, o
- c) un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 836 y 837, entre los nucleótidos 867 y 868 o entre los nucleótidos 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1.

En una realización, la presente invención se refiere a transformar una planta de *Brassica* con un gen *myb28* que comprende la SEQ ID NO: 24 o una secuencia que tiene al menos 97% (tal como al menos un 98% o al menos un 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 24.

En algunas realizaciones, se pueden introducir genes adicionales y fenotipos correspondientes en una planta de *Brassica*, incluyendo a modo de ejemplo uno o más genes para tolerancia a insectos, tal como un gen de *Bacillus thuringiensis* (B.t.), tolerancia a plagas tal como genes para el control de enfermedades fúngicas, tolerancia a herbicidas tal como genes que confieren tolerancia al glifosato y genes para mejoras de calidad tales como rendimiento, mejoras nutricionales, tolerancias ambientales o de estrés o cualquier cambio deseable en la fisiología de la planta, crecimiento, desarrollo, morfología o producto(s) de la planta. Por ejemplo, los genes estructurales incluirían cualquier gen que confiere tolerancia a insectos incluyendo, aunque no de forma limitativa, un gen de proteína de control de insectos de *Bacillus* como se describe en el documento WO 99/31248 y en las patentes de Estados Unidos n.º 5.689.052, 5.500.365 y 5.880.275. En otra realización, el gen estructural puede conferir tolerancia al herbicida glifosato como la conferida por genes que incluyen, pero no se limitan al gen EPSPS resistente al glifosato de la cepa CP4 de *Agrobacterium* (aroA: CP4), como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.633.435 o el gen de glifosato oxidorreductasa (GOX) como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.463.175.

Alternativamente, las secuencias codificantes de ADN pueden afectar a los fenotipos codificando una molécula de ARN no traducible que provoca la inhibición dirigida de la expresión de un gen endógeno, mediante mecanismos mediados por la cosupresión o a través de antisentido. El ARN también podría ser una molécula de ARN catalítica (es decir, una ribozima) modificada por ingeniería genética para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Por tanto, se puede utilizar cualquier gen que produzca una proteína o ARNm que exprese un cambio de fenotipo o morfología de interés en la presente invención.

UN NIVEL AUMENTADO DE GLUCOSINOLATO

Convenientemente, las expresiones "planta hortaliza crucífera con un nivel aumentado de glucosinolato" o "brócoli con un nivel aumentado de glucosinolato" significan una planta de hortaliza crucífera o de brócoli, respectivamente, con un nivel aumentado de glucosinolatos en comparación con una variedad tradicional de esa hortaliza crucífera o de brócoli. En el brócoli, la variedad tradicional puede ser *B. oleraceae* GD33, línea del obtentor 560216 o campo de identificación del obtentor número 2153.

La expresión "un nivel aumentado de glucosinolato" en una realización significa que la hortaliza crucífera (tal como el brócoli) tiene un nivel de 4-metilsulfínilbutil glucosinolato (MSB) y/o metilsulfínilpropil glucosinolato (MSP) que es de 2 a 3 veces el nivel de 4-metilsulfínilbutil glucosinolato (MSB) y/o metilsulfínilpropil glucosinolato (MSP) encontrados en una (variedad tradicional de) hortaliza crucífera estándar (tal como una [variedad tradicional de] estándar de brócoli) cultivada en condiciones similares.

Convenientemente, la expresión "un nivel aumentado de glucosinolato" en una realización significa que la hortaliza crucífera (tal como el brócoli) comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 μ moles/g de peso seco. Convenientemente, la expresión "un nivel aumentado de glucosinolato" significa que la hortaliza crucífera (tal como el brócoli) comprende al menos aproximadamente 10 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 14 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 16 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 20 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 25 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 30 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 50 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 75 μ moles/g de peso seco. Las hortalizas crucíferas (tal como el brócoli) con un nivel aumentado de glucosinolato se describen en Mithen *et al.* Theor. Appl. Genet. (2003) 106, 727-734; Sarikamis *et al.* Molecular Breeding (2006) 18, 219-228, o en el documento WO 99/52345.

En una realización, la hortaliza crucífera (tal como el brócoli) con un nivel aumentado de glucosinolato puede comprender 4-metilsulfínilbutil glucosinolato y/o 3-metilsulfínilpropil glucosinolato en concentraciones de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 μ moles/g de peso seco, convenientemente de aproximadamente 14 y aproximadamente 100 μ moles/g de peso seco, convenientemente de aproximadamente 16 y aproximadamente 100 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 20 y aproximadamente 100 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 30 y aproximadamente 100 μ moles/g de peso seco, convenientemente de aproximadamente 50 y aproximadamente 100 μ moles/g de peso seco.

Por ejemplo, el nivel de 4-metilsulfínilbutil glucosinolato en una hortaliza crucífera (tal como el brócoli) con un nivel aumentado de glucosinolato, por ejemplo, puede estar entre aproximadamente 8 a aproximadamente 55 μ moles/g de peso seco, convenientemente entre aproximadamente 10 a aproximadamente 55 μ moles/g de peso seco, convenientemente de 10 a aproximadamente 40 μ moles/g de peso seco. Convenientemente, el nivel de 4-metilsulfínilbutil glucosinolato en una hortaliza crucífera (tal como el brócoli) con un nivel aumentado de glucosinolato, por ejemplo, puede ser de al menos aproximadamente 8 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 10 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 15 μ moles/g de peso seco. Esto contrasta marcadamente con las hortalizas crucíferas (en particular el brócoli) comercializadas por los puntos de venta que normalmente tienen niveles de este glucosinolato en la región de 4-5 μ moles/g de peso seco.

Por ejemplo, el nivel de 3-metilsulfínilbutil glucosinolato en una hortaliza crucífera (tal como el brócoli) con un nivel aumentado de glucosinolato, por ejemplo, puede estar entre aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 μ moles/g de peso seco, convenientemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 10 μ moles/g de peso seco, convenientemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 8 μ moles/g de peso seco. Convenientemente, el nivel de 3-metilsulfínilbutil glucosinolato en una hortaliza crucífera (tal como el brócoli) con un nivel aumentado de glucosinolato, por ejemplo, puede ser de al menos aproximadamente 1,5 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 2 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 3 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 4 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 5 μ moles/g de peso seco. Esto contrasta marcadamente con las hortalizas crucíferas (en particular el brócoli) comercializadas por los puntos de venta que normalmente tienen niveles de este glucosinolato en la región de 0,5-1 μ moles/g de peso seco.

En una realización, los niveles de glucosinolatos en la hortaliza crucífera (tal como el brócoli) se determinan examinando todas las partes comestibles de la planta, tal como tanto las inflorescencias como los tallos comestibles del brócoli. En una realización, los niveles de glucosinolatos en la hortaliza crucífera (tal como el brócoli) se determinan examinando solo las hojas o solo las inflorescencias o solo las raíces.

Por ejemplo, en donde la hortaliza crucífera es una en donde se comen principalmente las hojas (tal como rúcula, arúgula, rabaniza, rúgula, col rizada o repollo, por ejemplo, a continuación preferentemente el nivel de glucosinolatos en la hortaliza crucífera se determina examinando solo las hojas.

En donde la hortaliza crucífera es una en donde se comen principalmente las inflorescencias (tal como brócoli, coles

de Bruselas o coliflor, por ejemplo, a continuación preferentemente el nivel de glucosinolatos en la hortaliza crucífera se determina examinando solo las inflorescencias.

5 En donde la hortaliza crucífera es una en donde se comen principalmente las raíces (tal como rábano o nabo, por ejemplo, a continuación preferentemente el nivel de glucosinolatos en la hortaliza crucífera se determina examinando solo la parte comestible de la raíz.

10 Preferentemente, son al menos las inflorescencias del brócoli (o solo las inflorescencias del brócoli) las que se utilizan en la presente invención.

15 En una realización, la expresión "un nivel aumentado de glucosinolatos" significa que las inflorescencias o raíces comestibles u hojas comestibles de hortalizas crucíferas contienen el nivel aumentado de glucosinolatos, por ejemplo de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 μ moles/g de peso seco. En esta realización convenientemente la expresión "un nivel aumentado de glucosinolatos" significa que las inflorescencias o raíces comestibles u hojas comestibles de hortalizas crucíferas comprenden al menos aproximadamente 10 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 14 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 16 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 20 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 25 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 30 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 50 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 75 μ moles/g de peso seco.

25 En una realización, la expresión "un nivel aumentado de glucosinolatos" significa que las inflorescencias de brócoli contienen el nivel elevado de glucosinolatos, por ejemplo de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 μ moles/g de peso seco. En esta realización convenientemente la expresión "un nivel aumentado de glucosinolatos" significa que las inflorescencias de brócoli comprenden al menos aproximadamente 10 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 14 μ moles/g de peso seco, al menos aproximadamente 16 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 20 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 25 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 30 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 50 μ moles/g de peso seco, convenientemente al menos aproximadamente 75 μ moles/g de peso seco. Se entenderá que la expresión hortaliza crucífera que tiene un nivel aumentado de glucosinolatos (tal como el brócoli que tiene un nivel aumentado de glucosinolatos) se refiere no solo al material de la planta en su estado natural fresco, es decir, como cabezas enteras, tal como inflorescencias y tallos de brócoli, sino también a la hortaliza crucífera (tal como el brócoli) cuando se ha sometido a una o más etapas de elaboración adicionales tales como, por ejemplo, florecimiento, congelación rápida individual (IQF; del inglés, individual quick freezing), maceración, homogeneización, secado, congelación, compactación, etc.

HORTALIZAS CRUCÍFERAS

40 El experto en la materia será consciente de que se conocen plantas que comprenden glucosinolatos distintos del brócoli de glucosinolatos elevado. El glucosinolatos está presente en plantas del orden Capparales. Este orden incluye aproximadamente 18 familias, de las que Brassicaceae y Capparaceae son las dos más grandes.

45 Las hortalizas crucíferas (por ejemplo, los cultivos de hortalizas crucíferas) de la familia Brassicaceae que contienen glucosinolatos incluyen los siguientes cultivos de hortalizas crucíferas:

- brócoli
- rúcula (que incluye *Sisymbrium officinale*; *Eruca sativa* (arúgula), *Diplotaxis eruroides* (rabaniza), *Diplotaxis tenuifolia* (rúgula) y *Bunias orientalis* (bunia oriental)); y
- 50 • berro (que incluye *Rorippa nasturtium-aquaticum* y *Nasturtium officinale*).
- coliflor,
- 55 • col rizada,
- nabo,
- berzas,
- 60 • colinabo,
- coles de Bruselas,
- 65 • repollo chino,

- canola,
- repollo y
- 5 • rábano.

Los expertos en la técnica apreciarán las muchas ventajas de los métodos y composiciones proporcionados en la presente invención. Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los presentes inventores para que funcionen bien en la práctica de la invención y por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica.

Ejemplos

15 La producción de glucosinolatos en hortalizas crucíferas es compleja. La Fig. 4 muestra un esquema del flujo de azufre en *Brassica*. Se han desarrollado hortalizas crucíferas con un nivel aumentado de glucosinolatos (por ejemplo, brócoli con un nivel aumentado de glucosinolatos), por ejemplo, como se describe en los documentos WO99/52345 y PCT/GB2009/001648.

20 *Brassica villosa* tiene un nivel muy elevado de 3-metiltiopropil glucosinolatos. Cuando se cruza con brócoli (*Brassica oleracea*), este se convierte en 4-metilsulfínibutil glucosinolato (glucorafanina). Los inventores han determinado que *B. villosa* aporta los genes para aumentar la cantidad de glucosinolato producido en una planta de *Brassica*.

25 Se ha encontrado que el rasgo de glucorafanina elevada es dominante, por lo que solo es necesario que se produzca introgresión en un parental endogámico/doble haploide para los híbridos. Una línea de cría de brócoli doble haploide derivada del cultivar Green Duke (denominado GD DH, Bouhuon, E. J. R., Keith, D. J., Parkin, I. A. P., Sharpe, A. G., y Lydiate, D. J. (1996) Theor. Appl. Genet. 93, 833-839) está disponible.

30 Antes de la presente invención, se utilizaban marcadores metabólicos o moleculares de *metiltioalquilmalato sintasa* (*MAM*) en programas de mejora vegetal. Se sabía que *MAM1* y *MAM3* se asociaban estrechamente con rasgos de glucosinolatos elevados.

35 Sin embargo, sorprendentemente, los presentes inventores observaron que algunos cultivares de *Brassica* con fenotipo de glucosinolatos elevados (por ejemplo, glucorafanina) no poseían los alelos del marcador *MAM* aunque estuvieran asociados con el rasgo, concluyendo por tanto que los marcadores *MAM* no estaban necesariamente estrechamente unidos o que la clave del perfil de glucosinolatos elevados y por tanto su utilización como marcadores en mejora vegetal no era fiable para el rastreo de este rasgo.

40 Por tanto, los inventores buscaron un marcador para glucosinolatos elevados que pudiera ser fiable y utilizado sistemáticamente para determinar el genotipo de una planta con un nivel aumentado de glucosinolato (particularmente una glucorafanina aumentada).

45 Los inventores han identificado sorprendentemente el locus *Myb28* del factor de transcripción como un locus clave que regula la biosíntesis de glucosinolatos derivados de metionina en hortalizas crucíferas (por ejemplo, brócoli).

EJEMPLO 1

RT-PCR en tiempo real de MYB28

50 La secuencia de *Myb28* se identificó mediante búsqueda BLAST utilizando la secuencia de *B. rapa* para *Myb28* (Bra029311) en la base de datos de Brassica BRAD (Cheng *et al.*, 2011 BRAD, the genetics and genomics database for Brassica plants. BMC Plant Biology 2011;11:136. doi: 10.1186/1471-2229-11-136). El ensayo se diseñó utilizando el software ABI PRISM Primer Express v2 (Applied Biosystems). Los cebadores y la sonda TaqMan con modificaciones 5'-FAM y 3'- TAMRA se adquirieron de MWG UK y las secuencias (SEQ ID NO: 26-28) son:

55 Myb28 para 5'-CTCTTCCTCTTTCTCGGGTTT-3',
Myb28 Rev 5'-TGCAACTCAAGGAACCTCTCTGA-3',
Myb28 sonda 5'-AACCCGGTTTCCGAGATCACACAC-3'.

60 Los niveles de ARNm de *Myb28* se determinaron mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el sistema de detección de secuencias ABI Prism Step One Plus (Applied Biosystems). Las reacciones de RT-PCR en tiempo real se llevaron a cabo en una placa óptica de microamperios de 96 pocillos en un volumen total de 20 µl por pocillo que contiene el kit de reactivos de mezcla maestra Taqman® RNA-TO-CT 1-Step (Applied Biosystems), 20 ng de ARN total, 0,25Uul⁻¹ Multiscribe™ y concentraciones optimizadas de cebadores y sondas.

65 Las condiciones de RT-PCR en tiempo real fueron como sigue: un ciclo de 48 °C durante 30 minutos, un ciclo de 95

°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y un ciclo a 60 °C durante 1 minuto.

Los datos de Myb28 se analizaron utilizando una curva estándar generada por una dilución en serie del ARN total de una planta Ironman.

5 La Fig. 3 muestra la expresión de *Myb28* en hojas de cultivares de brócoli (los cultivares 1199, 1639 y HG1, siendo todos cultivares con niveles aumentados de glucosinolato (por ejemplo, cultivares de glucorafanina elevada).

SECUENCIACIÓN DE MYB28

10 La secuencia de *Myb28* se identificó mediante búsqueda BLAST utilizando la secuencia de *B. rapa* para *Myb28* (Bra029311) en la base de datos de Brassica BRAD (Cheng, F.; Liu, S.; Wu, J.; Fang, L.; Sun, S.; Liu, B.; Li, P.; Hua, W.; Wang, X., BRAD, The genetics and genomics database for Brassica plants. BMC Plant Biology 2011, 11, 136).

15 Los cebadores se diseñaron utilizando Primer3 versión 0.4.0 (Rozen S, S. H. J., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, Krawetz S, M. S., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, 2000; págs. 365-386) y se adquirieron de MWG UK.

20 El ADN se extrajo de material de las hojas utilizando el kit QIAGEN DNeasy Plant Maxi (QIAGEN). MYB28 Para 5'-TCACGAACATGGAGAAGGTG-3' (SEQ ID NO: 3), MYB28 REV 5'-TGAGCTTGACCGGGAGTATC-3' (SEQ ID NO:4).

25 Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20 µl que contiene 1X tampón de reacción Green GoTaq® (Promega), MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM, cebadores 0,2 µM, 0,5 unidades de ADN polimerasa GoTaq® y 15-50 ng de ADN.

30 Las condiciones de la PCR son como sigue: 95 °C durante 2 min seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 seg, 53 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, antes de la extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se procesan mediante electroforesis en gel sobre un gel de agarosa y se purifican utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) antes de enviarlos a TGAC (Norwich, Reino Unido) para su secuenciación.

EJEMPLO 2

35 IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN LA REGIÓN CODIFICANTE DE MYB28 ENTRE LÍNEAS DE MEJORA DE *B. VILLOSA* Y *B. OLERACEA*

40 Utilizando la secuencia de codificación completa de ARNm de MYB28 de *Brassica oleracea* var. *italica* R2R3 (número de registro de NCBI GQ478992.1), se diseñaron cebadores a mano (Tabla 1) para amplificar fragmentos entre 300 y 500pb.

Tabla 1: secuencias de cebadores (SEQ ID NO: 3-23) diseñadas sobre la secuencia codificante de *B. oleracea* para amplificar fragmentos de *Myb28* en diferentes líneas de mejora vegetal para secuenciar. Estos cebadores se diseñaron a mano.

Nombre del cebador	Secuencia (5' > 3')	Tamaño	Comentario
OD00876	TCACGAACATGGAGAAGGTG	20	
OD00877	TGAGCTTGACCGGGAGTATC	20	combi con 876
OD00878	CTAACTACCTAAAACCTGAG	20	
OD00879	CTAGTGGCTTGTGAGTCAC	19	combi con 878
OD00880	CCTCGTTTTATAAGATAACGTC	22	secuencia codificante
OD00881	CTCGATATAGATCAGGACTAC	21	combi con 880
OD00882	GATGAGACTTCTTGGGACAC	20	secuencia codificante
OD00883	GAGGACGATTCTTGAGTC	19	combi con 882
OD00884	ACCTTCCATGGAAGCAGAC	19	secuencia codificante
OD00885	TGTGTTTGATTAGCAATATGTG	22	combi con 884
OD00886	AGCAGCATGGAGCATGATG	19	secuencia codificante
OD00887	TGTGTCGAGAAGGGCTG	18	combi con 886
OD00888	CCAGCCACCTTCTCCATG	18	secuencia codificante

(continuación)

Nombre del cebador	Secuencia (5' > 3')	Tamaño	Comentario
OD00889	ACGCCTCTTACTCCATGAG	19	combi con 888
OD00890	TCCTATCAAAATTTACTTTTCCTG	23	secuencia codificante
OD00891	CAGTCTGCAACTCTTTCCAC	20	combi con 890
OD00892	CTTTAGGTGGTCGGTCATAG	20	secuencia codificante
OD00893	TCAGGGTAAAACGTTGTTTG	20	combi con 892
OD00951	TGTATTTGACAATTCTCTGATG	22	reemplazo 892 combi con 884
OD00952	TTCATGGAAGTGGCCTTAG	19	anidado de 884
OD00953	CTTGGGACTAACAACCATGA	20	anidado de 880 combi con 881

5 Los cebadores en la Tabla 1 se designan en las SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 23, respectivamente, en el presente documento. Utilizando estos cebadores, se amplificaron fragmentos de individuos que contienen el alelo FT69 de *B. villosa* e individuos que contienen el alelo de *B. oleracea*. Los individuos utilizados para identificar el alelo de *B. oleracea* se eligieron al azar del material de mejora vegetal. Se amplificaron diferentes segmentos de la secuencia codificante de individuos que contienen el alelo FT69 de *B. villosa* y el alelo de *B. oleracea*, se extrajo ADN del material de la hoja utilizando placas de filtro Whatman.

10 Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20 µl que contiene 1 x tampón de PCR que contiene MgCl₂, dNTP 0,2 mM, cebadores 0,1 µM, 0,4 unidades de ADN polimerasa DreamTaq® (Fermentas) y 50-100 ng de ADN.

15 Condiciones de la PCR como sigue: 95 °C durante 2 min seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 seg, 56 °C durante 30 seg y 72 °C durante 1 min, antes de la extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se purificaron utilizando Exo nucleasa y SAP antes de que se secuenciaron utilizando BigDye (Life Technologies).

20 Las secuencias de segmentos se alinearon en dos cóntigos (FT69 y oleracea) utilizando el Sequencer 5.0 (Gene Codes Corporation) y utilizando una superposición mínima de 20 pares de bases y una coincidencia mínima del 90%). Está claro que las líneas de MSB y MSP altas contienen todas el fragmento *Myb28* del alelo FT69 de *B. villosa* y las líneas de control constituyen individuos que contienen el alelo de *B. oleracea*.

Los individuos utilizados para las líneas de *B. oleracea* son:

25 GD33

línea del obtentor 560216

campo de identificación del obtentor número 2153.

30 Los individuos utilizados que contienen el alelo FT69 de *B. villosa* son:

Línea del obtentor 560526 (MSP)

Línea del obtentor 580333 (MSB)

35 Línea del obtentor BRM 51-1162 (MSP)

Línea del obtentor BRM51-1210 (MSP).

Los individuos utilizados para identificar el alelo de *B. oleracea* se eligieron al azar del material de mejora vegetal.

40 Al comparar estas alineaciones de secuencia, se descubrieron polimorfismos que pueden utilizarse para la selección basada en marcadores para seleccionar el alelo *Myb28* de elección (véase la Figura 1).

45 Se detectan un total de 26 polimorfismos de característica única (SFP) (de los cuales hay 16 SNP y 10 indeles) en una secuencia con una longitud total de 2202 pb. Estos se muestran en la Fig. 1, que muestra una alineación de secuencias entre una secuencia consenso del locus *Myb28* para el brócoli, con un nivel aumentado de glucosinolato, por ejemplo, *B. villosa*, (FT69) y una secuencia consenso del locus *Myb28* para brócoli, que no tiene un nivel aumentado de glucosinolato, por ejemplo, *B. oleracea*, (*Oleracea*). Estos SFP son indicativos de la introgresión de *B. villosa*.

50 La Fig. 2a muestra la SEQ ID NO: 1; una secuencia de un fragmento de ácido nucleico que comprende el locus *Myb28* de *Brassica oleracea* (brócoli) que no tiene niveles aumentados de glucosinolato. Los SFP (incluidos tanto

SNP como indeles, por ejemplo, los nucleótidos que se pueden suprimir) están sombreados. Los nucleótidos entre los que se puede insertar una SFP (inserción indel) están subrayados.

La Fig. 2b muestra la SEQ ID NO: 2; una secuencia de un fragmento de ácido nucleico que comprende el locus Myb28 de *Brassica oleracea* (brócoli) que no tiene niveles aumentados de glucosinolato. Los SFP (incluidos tanto SNP como indeles, por ejemplo, los nucleótidos que se pueden suprimir) están sombreados. Los fragmentos entre paréntesis <> (y nucleótidos en minúscula) corresponden a SFP (indeles, que son inserciones) en la secuencia de *Brassica oleracea*, cuyas inserciones se encuentran en el brócoli de glucosinolatos elevados (por ejemplo, *Brassica villosa*).

Los polimorfismos detectados son:

- a. polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en una posición correspondiente al nucleótido 83, 136, 226, 563, 610, 830, 995, 1116, 1513, 1577, 1606, 1620, 1825, 1863, 1877 o 2026 de la SEQ ID NO: 1 y
- b. polimorfismos en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1 y
- c. polimorfismos en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 836 y 837, entre los nucleótidos 867 y 868 o entre los nucleótidos 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1.

EJEMPLO 3

VALIDACIÓN DE NUEVO MARCADOR

Se diseñó un ensayo TaqMan (NBOLI009111370) basado en uno de los polimorfismos de secuencia identificados en el Ejemplo 2.

Secuencia NBOLI009111370 (SEQ ID NO:29):

```
GACCACCTAAAGACAAGAATAGTGAAAGAGATAAGATGGAAGACCAAAGTTAATCA
AATTTATTTTGAAGCTTTT[C/T]TATGGAATAGAGACTAAAATGATGTGTGCTATTGCA
ATTTTTAGTCACATATTGCTAATCAAACACATATTTTGCATCAGAGAATTGTCAAATA
CATGAAAAAATAAAGAATAATTTTT
```

Cebador directo (SEQ ID NO: 30): GTGAAAGAGATAAGATGGAAGACCAAAGT

Cebador inverso (SEQ ID NO: 31): GTGACTAAAAATTGCAATAGCACACATCA

Sonda Vic (SEQ ID NO: 32): CTATTCCATAGAAAAGC

Sonda Fam (SEQ ID NO: 33): CTATTCCATAAAAAAGC

Carga de placas con 20ng de ADN molde en un volumen de 5uL. Adición de 10ul de mezcla maestra (2 partes de cada mezcla 1X PCR, 0.437uL de agua, 2.5uL de mezcla de Q PCR (ROX), 0.063uL de mezcla de ensayo, 2uL de cebadores a 5ng/uL) en cada pocillo para un volumen final de 15uL.

Las condiciones de la PCR son como sigue: 50 °C durante 2 min seguido de 95 °C durante 2 min, a continuación, 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 1 min.

Este ensayo de Taqman se ejecutó en un panel de germoplasma representativo de 102 líneas (Figura 6). basándose en la presencia esperada de la introgresión de *B. villosa*, se determinó que este marcador es 100% predictivo del fenotipo de glucosinolato elevado basado en la presencia del alelo de *B. villosa*.

EJEMPLO 4

DESARROLLO DE NUEVOS MARCADORES

Se han determinado las secuencias conservadas (la secuencia entre los SFP) entre el alelo FT69 y el alelo *B. oleracea* y se han determinado y se pueden utilizar para el diseño de cebadores y el recorrido del genoma como se describe en Siebert *et al.*, (1995) (An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. Nucleic Acids Res. 23: 1087-1088) para la determinación de secuencia y polimorfismo fuera de la región codificante de Myb28. Los polimorfismos adicionales determinados a partir de este método de recorrido por el genoma serán útiles adicionalmente para rastrear el rasgo de glucosinolato elevado, debido a su estrecha proximidad física y enlace genético con los otros marcadores descritos en el presente documento. Estos marcadores pueden estar dentro de 1, 3, 5 o 10 cM para *Myb28* y pueden proporcionar ensayos de marcadores adicionales útiles para rastrear el fenotipo

de glucosinolato elevado.

Por tanto, en una realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de al menos 18 nucleótidos contiguos que están conservados entre SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 24 cuando se alinean. Las secuencias alineadas se utilizan para preparar un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de al menos 18 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 1, en donde la secuencia no está presente dentro de la SEQ ID NO: 24. Alternativamente, las secuencias conservadas se utilizan para preparar un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de al menos 18 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 24, en donde la secuencia no está presente dentro de la SEQ ID NO: 1.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Seminis Vegetable Seeds, Inc. Plant Bioscience Limited

<120> Marcadores genéticos para Myb28

<130> P100356EP

<150> US 61/700.731

<151> 13/09/2012

<160> 35

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2186

<212> ADN

<213> Brassica oleracea

<400> 1

ES 2 814 849 T3

gaaaatcaca gttcacgcct cttactccat gagcttctct attctcatcc tagtggtata	60
atcttgcaaa cacatataga aagcaagggt tggagtgtac gagaaaaaca tgaaaacacc	120
tagaagctct gtgggtgaga cccaagagcg tttctcgatt agtttcatat acagatgcat	180
cagagttctc atcaaccgat ctacttcttt cttatcttat tagaagaaaa aaatcctatc	240
aaaatttact ttcttgcaag tatatctttc tttacatttt cattttcttg agtggtatct	300
gagtgaagtt atattaaaa attgtaatag agttcatata tatcgaaaat gtcaagaaag	360
ccatggtgtg tcggagaagg gctgaagaaa ggggcatgga ccaccgagga agataagaaa	420
ctcatctctt acatccatga acatggagaa ggaggctggc gcgacattcc tcaaaaagct	480
ggtaaatatc tattatata tttttggtaa atttttaaaa catatatatg tttgtttgg	540
atgtgatgta tgaaagtttt atgttgaata tgggtgttta ctaggrttga aaaggtgtgg	600
aaagagttgt agactgcat ggactaacta cctaaaacct gagatcaaaa gaggcgagtt	660
tagttcagag gaggaacaga ttatcatcat gctccatgct gctcgtggca acaagtacgt	720
ttatctttaga ccaaaaaaaaa acaagtacgt ttatctttaa caaaaaggac gattatata	780
ttttatgtgt gtatggatcc tccagtgatc atcattctag ttttctcttt ttttttatac	840
cgcaacaaa tttcattagt aaaaaaatta aaattccaaa gtcaatattc aaaaacacag	900
tgttatata ataatcctat atatgtcata tattaaaaaa gtacaacatg agaaatgaat	960
ttaagtatgc ttctaaagcg aagttttact tcccgaaaaa ttattcttta tttttttcat	1020
gtatttgaca attctctgat gcaaaatatg tgtttgatta gcaatatgtg actaaaaatt	1080
gcaatagcac acatcatttt agtctctatt ccataaaaaa gcttcaaaaat aaatttgatt	1140
aactttggtc ttccatctta tctctttcac tattcttgtc tttaggtggt cggcatagc	1200
kagacattta cctagaagaa cmgacaatga gatcaagaac tactggaaca cacatctcaa	1260

ES 2 814 849 T3

gaaacgtttg atcgaacagg gtactgatcc cgtgactcac aagccactag cttctaatac 1320
aaaccctact gtacctgaga atttgcattc cctagatgca tctagtaatt ccgacaagca 1380
atactcccgg tcaagctcaa tgccttccat gtcttgact ccttcctccg gtttcaacac 1440
ggttttcgag aataccagca aagatgggac accagttcgt gaggacgatt ccttgagtcg 1500
caagaaacgt ttttaagaaat caagttctac atcaaggctt ttgaacaaag ttgcggttaa 1560
ggccacttcc atgaaagaag ctttgtctgc ttccatggaa ggtagtttga atgctaatac 1620
aagcttttcc aatggctact ctgagcagat tctcaatgaa gatgatagtt ctaatgcatc 1680
cctcataaac actctcggcg agttcgatcc cttcctccaa acaacgtttt accctgagaa 1740
tgagatgaat actacttctg atctcgggat agatcaggac tacttctcac attttctcga 1800
aaatttcggc agagatgatg accacaatga ggagcactac atgaatcata actatggtca 1860
tgatcttctt atgtccgatg tgtcccaaga agtctcatca actagcgttg atgatcaaga 1920
caatactaat gagggttggt caaattatct tcttgaccat gctgatttta tacatgacat 1980
ggattctgat tccctcggaa agcatctcat atgaatcttc gtgcccaagc agaaaggttt 2040
caaacttttg aaacttgtca gaacaagaag ttatgtatgt attctattat atggattggt 2100
tagtatatgt ccaagatcat ggttgtagt cccaagttta gggtttgtat aatatacaat 2160
aagggacgtt atcttataaa acgagg 2186

<210> 2
<211> 2202
<212> ADN
<213> Brassica oleracea

5

<400> 2

gaaaatcaca gttcacgcct cttactccat gagcttctct attctcatcc tagtgttata 60
atcttgcaaa cacatataga aagcaagggt tggagtgtac gagaaaaaca tgaaaacacc 120
tagaagctct gtgggtgaga cccaagagcg tttctcgatt agtttcatat acagatgcat 180
cagagtctc atcaaccgat ctacttcttt cttatcttat tagaagaaaa aaatcctatc 240
aaaatttact ttcctgcaag tatatTTTTt tttacatttt cattttcttg agtgttatTT 300
gagtgaagtt atattaaaat attgtaatag agttcatata tatcgaaaat gtcaagaaag 360
ccatgttggtg tcggagaagg gctgaagaaa ggggcatgga ccaccgagga agataagaaa 420
ctcatctctt acatccatga acatggagaa ggaggctggc gcgacattcc tcaaaaagct 480
ggtaaatatc tattatatat tttttggtaa atttttaaaa catatatatg tttgtttggT 540
atTTgatgta tgaaagTTTT atgTTgaata tggTgTTTTa ctaggrTTga aaaggTgTgg 600
aaagagTtgt agactgcgat ggactaacta cctaaaacct gagatcaaaa gaggcgagTt 660
tagTtcagag gaggaacaga ttatcatcat gctccatgct gctcgtggca acaagtacgt 720

10

ES 2 814 849 T3

ttatTTtaga ccaaaaaaaa acaagtagct ttatTTTtaa caaaaaggac gattatatat 780
 TTTtatgtgt gtatggatcc tccagtgatc atcattctag TTTTctcttt TTTTttttat 840
 accgcaaca aatttcatta gtaaaaaaaaa taaaattcc aaagtcaata ttcaaaaaca 900
 cagtgttata tatataatcc tatatatgtc atatattaaa aaagtatatt aaaaaagtac 960
 aacatgagaa atgaatttaa gtatgcttct aaagcgaagt tttacttccc gaaaaattat 1020
 tctttatTTT tttcatgtat ttgacaattc tctgatgcaa aatatgtgtt tgattagcaa 1080
 tatgtgacta aaaattgcaa tagcacacat cattttagtc tctattccat aaaaaagctt 1140
 caaataaat ttgattaact ttggtcttcc atcttatctc tttcactatt cttgtcttta 1200
 ggtggtcggc catagckaga catttaccta gaagaacmga caatgagatc aagaactact 1260
 ggaacacaca tctcaagaaa cgtttgatcg aacagggtac tgatcccgtg actcacaagc 1320
 cactagcttc taatacaaac cctactgtac ctgagaattt gcattcccta gatgcatcta 1380
 gtaattccga caagcaatac tcccggTcaa gctcaatgcc ttccatgtct tgtactcctt 1440
 cctccggttt caacacgggt ttcgagaata ccagcaaaga tgggacacca gttcgtgagg 1500
 acgattcctt gagtcgcaag aaacgTTTTa agaaatcaag ttctacatca aggctTTTga 1560
 acaaagttgc ggctaaggcc acttccatga aagaagcttt gtctgcttcc atggaaggta 1620
 gtttgaatgc taatacaagc TTTTccaatg gctactctga gcagattctc aatgaagatg 1680
 atagttctaa tgcattccctc ataaacactc tcgccgagtt cgatccctc ctccaaacaa 1740
 cgTTTTacc tggaaatgag atgaatacta cttctgatct cggtatagat caggactact 1800
 tctcacattt tctcgaaaat ttcggcagag atgatgacca caatgaggag cactacatga 1860
 atcataacta tggatcatgat cttcttatgt ccgatgtgtc ccaagaagtc tcatcaacta 1920
 gcgttgatga tcaagacaat actaatgagg gttggtcaaa ttatcttctt gaccatgctg 1980
 atTTTataca tgacatggat tctgattccc tcggaaagca tctcatatga atcttcgtgc 2040
 ccaagcagaa aggtTTTcaa cTTTTgaaac ttgtcagaac aagaagttat gtatgtattc 2100
 tattatatgg attgTTTtagt atatgtccaa gatcatgggt gttagtccca agtttagggt 2160
 ttgtataata tacaataagg gacgttatct tataaaacga gg 2202

5 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador OD00876

<400> 3
 tcacgaacat ggagaagggtg 20

15 <210> 4
 <211> 20

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OD00877	
5	<400> 4	
	tgagcttgac cgggagtac	20
10	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OD00878	
15	<400> 5	
	ctaactacct aaaacctgag	20
20	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OD00879	
25	<400> 6	
	ctagtggtt gtgagtcac	19
30	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OD00880	
35	<400> 7	
	cctcgtttta taagataacg tc	22
40	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OD00881	
45	<400> 8	
	ctcgatatag atcaggacta c	21
50	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OD00882	
55	<400> 9	
	gatgagactt cttgggacac	20
60	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OD00883	
65	<400> 10	

ES 2 814 849 T3

	gaggacgatt ccttgagtc	19
5	<210> 11 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD00884	
10	<400> 11 accttccatg gaagcagac	19
15	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> cebador OD00885	
20	<400> 12 tgtgttggat tagcaatag tg	22
25	<210> 13 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD00886	
30	<400> 13 agcagcatgg agcatgatg	19
35	<210> 14 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD00887	
40	<400> 14 tgtgtcggag aagggctg	18
45	<210> 15 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD00888	
50	<400> 15 ccagccacct tctccatg	18
55	<210> 16 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD889	
60	<400> 16 acgcctctta ctccatgag	19
65	<210> 17 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 814 849 T3

	<220>	
	<223> cebador OD0890	
5	<400> 17 tcctatcaaa atttactttc ctg	23
10	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD00891	
15	<400> 18 cagtctgcaa ctctttccac	20
20	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD00892	
25	<400> 19 ctttaggtgg tcggtcatag	20
30	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD00893	
35	<400> 20 tcagggtaaa acgtgtttg	20
40	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD00951	
45	<400> 21 tgtatttgac aattctctga tg	22
50	<210> 22 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD00952	
55	<400> 22 ttcatggaag tggccttag	19
60	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OD00953	
65	<400> 23 ctgggacta acaacctga	20

ES 2 814 849 T3

<210> 24
<211> 2165
<212> ADN
<213> Brassica villosa FT69

5

<400> 24

gaaaatcaca gttcacgcct cttactccat gagcttctct attctcatcc tagtggtata	60
atcttgcaaa cacatataga aagcaagatt tggagtgtac gagaaaaaca tgaaaacacc	120
tagaagctct gtgggtaaga cccaagagcg tttctcgatt agtttcatat acagatgcat	180

ES 2 814 849 T3

cagagttctc atcaaccgat ctacttcttt cttatcttat tagaaaaaaa aaatcctatc 240
 aaaatttact ttctgcaag tatatTTTTtC tttacatTTtT cattttcttg agtgttatTT 300
 gagtgaagtt atattaaaat attgTtcata tatatcgaaa atgtcaagaa agccatgTtg 360
 tgtcggagaa gggctgaaga aaggggcatg gaccaccgag gaagataaga aactcatctc 420
 ttacatccat gaacatggag aaggaggctg gcgcgacatt cctcaaaaag ctggTTaata 480
 tctattatat atTTTTtggT aaatTTTTta aacatatatg tttgTttggT atttgatgTa 540
 tgaaagTTTT atattgaatg tggTgTTTTa ctaggattga aaaggTgtgg aaagagTtgc 600
 agactgcgat ggactaacta cctaaaacct gagatcaaaa gaggcgagtt tagttcagag 660
 gaggaacaga ttatcatcat gctccatgct gctcgtggca acaagtacgt ttatTTttaga 720
 ccaaaaaaaa acaagtacgt ttatTTTTta caaaaaggac gattatatat ttttgtgtgt 780
 atggatcctc cagtgatcat cattctagtt ttctcttctt ttttttatac cgcaaaacaaa 840
 tttcattagt aaaaaaaatt aaaattccaa agtcaatatt caaaaacaca gtgttatata 900
 atcctatata tgtcatatat taaaaaagta tattaaaaaa gtacaacatg agaaatgaat 960
 ttaagtatgc ttctaaagcg aagTTTTact tccccaaaaa ttattctTTa tttttttcat 1020
 gtatttgaca attctctgat gcaaaatatg tgtttgatta gcaatatgtg actaaaaatt 1080
 gcaatagcac acatcatttt agtctctatt ccatagaaaa gcttcaaaat aaatttgatt 1140
 aactttggtc ttccatctta tctctttcac tattcttgtc tttaggtggT cggTcatagc 1200
 kagacattta cctagaagaa cmgacaatga gatcaagaay tactggaaca cacatctcaa 1260
 gaaacgTTtG atcgaacagg gtactgatcc cgtgactcac aagccactag cttctaatac 1320
 aaaccctact gtacctgaga atttgcatTC cctagatgca tctagttcog acaagcaata 1380
 ctcccggTca agctcaatgc cttccatgTc ttgtactcct tcctccggtt tcaacacggT 1440
 tttcgagaat accagcaaaG atgggacacc agttcgtgag gacgattcct tgagtcgcaa 1500
 gaaacgTTtG aagaaatcaa gttctacatc aaggctTTtG aacaaagTtG cggctaaggc 1560
 cacttccatg aaaaaagctt tgtctgcttc catggaaggT agcttgaatg ctaatataag 1620
 cttttccaat ggctactctg agcagattct caatgaagat gatagttcta atgcatccct 1680
 cataaacact ctcgccgagt tcgatccctt cctccaaaca acgTTTTacc ctgagaatga 1740
 gatgaatact acttctgatc tcggtataga tcaggactac ttctcacatt ttctcgaaaa 1800
 tttcggcaac cataatgagg agcactacat gaatcataac tatggTcatg gtcttcttat 1860
 gtccatgtg tcccagaag tctcatcaac tagcgttgat gatcaagaca atactaatga 1920
 gggTtggTca aattatcttc ttgaccatgc tgatTTtata catgacatgg attctgattc 1980
 cctcggaaag catctcatat gaatcttcgt gcctaagcag aaaggTTtca aacttgtcag 2040

ES 2 814 849 T3

aacaagaagt tatgtatgta ttctattata tggattgttt agtatatgtc caagatcatg 2100

gttgttagtc ccaagtttag ggtttgtata atatacaata agggacgtta tcttataaaa 2160

cgagg 2165

5 <210> 25
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia para inserción entre los nucleótidos 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1

<400> 25
 tattaaaaa gta 13

15 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador Myb28

<400> 26
 ctcttctct ttctcgggt tt 22

25 <210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador Myb28 Rev

35 <400> 27
 tgcaactcaa ggaacctctc tga 23

40 <210> 28
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sonda Myb28

45 <400> 28
 aaccgggtt ccgagatcac cacac 25

50 <210> 29
 <211> 196
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Ensayo Taqman NBOLI009111370

55 <400> 29

ES 2 814 849 T3

	gaccacctaa agacaagaat agtgaaagag ataagatgga agaccaaagt taatcaaatt	60
	tattttgaag cttttypatg gaatagagac taaaatgatg tgtgctattg caatttttag	120
	tcacatattg ctaatcaaac acatattttg catcagagaa ttgtcaaata catgaaaaaa	180
	ataaagaata attttt	196
5	<210> 30 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador directo	
	<400> 30 gtgaaagaga taagatgga gaccaaagt	29
15	<210> 31 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador inverso	
	<400> 31 gtgactaaaa attgcaatag cacacatca	29
25	<210> 32 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> sonda Vic	
35	<400> 32 ctattccata gaaaagc	17
40	<210> 33 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sonda Fam	
45	<400> 33 ctattccata aaaaagc	17
50	<210> 34 <211> 2165 <212> ADN <213> Brassica villosa FT69	
	<400> 34	

ES 2 814 849 T3

gaaaatcaca gttcacgcct cttactccat gagcttctct attctcatcc tagtgttata 60
 atcttgcaaa cacatataga aagcaagatt tggagtgtac gagaaaaaca tgaaaacacc 120
 tagaagctct gtgggtaaga cccaagagcg tttctcgatt agtttcatat acagatgcat 180
 cagagttctc atcaaccgat ctacttcttt cttatcttat tagaaaaaaaa aaatcctatc 240
 aaaatttact ttctgcaag tatatTTTTTc tttacatttt cattttcttg agtgttatTT 300
 gagtgaagtt atattaaaaat attgttcata tatatcgaaa atgtcaagaa agccatgTTg 360
 tgtcggagaa gggctgaaga aaggggcatg gaccaccgag gaagataaga aactcatctc 420
 ttacatccat gaacatggag aaggaggctg gcgcgacatt cctcaaaaag ctggTTaata 480
 tctattatat atTTTTTggt aaTTTTTaa aacatatatg tttgTTTggt atttgatgTa 540
 tgaaagTTTT atattgaatg tggTgTTTTa ctaggattgA aaaggTgTgG aaagagTTgC 600
 agactgCGat ggactaaCTa cctaaaacCT gagatcaaaa gaggcgagTT tagttcagag 660
 gaggaacaga ttatcatcat gctccatgct gctcgtggca acaagtacgt ttatTTTtaga 720
 ccaaaaaaaaa acaagtacgt ttatTTTtaa caaaaaggac gattatatat tttTgTgTgT 780
 atggatcctc cagtgatcat cattctagtt ttctcttctt tttttatac cgcaaacaaa 840
 tttcattagt aaaaaaaaaatt aaaattccaa agtcaatatt caaaaacaca gtgTTatata 900
 atcctatata tgtcatatat taaaaaagTa tattaaaaaa gtacaacatg agaaatgaat 960
 ttaagtatgc ttctaaagcg aagTTTTact tccccaaaaa ttattctTTa tttttttcat 1020
 gtatttgaca attctctgat gcaaaatatg tgtttgatta gcaatatgtg actaaaaaatt 1080
 gcaatagcac acatcatttt agtctctatt ccatagaaaa gcttcaaaat aaatttgatt 1140
 aactttggtc ttccatctta tctctttcac tattcttgTc tttaggtggt cggTcatagc 1200
 kagacattta cctagaagaa cmgacaatga gatcaagaay tactggaaca cacatctcaa 1260
 gaaacgTTTg atcgaacagg gtactgatcc cgtgactcac aagccactag cttctaatac 1320
 aaaccctact gtacctgaga atttgcattc cctagatgca tctagttccg acaagcaata 1380
 ctcccggTca agctcaatgc cttccatgTc ttgtactcct tctcCGgTT tcaacacggT 1440
 tttcgagaat accagcaaag atgggacacc agttcgtgag gacgattcct tgagtcgcaa 1500
 gaaacgTTTg aagaaatcaa gttctacatc aaggctTTTg aacaaagTTg cggctaaggc 1560
 cacttccatg aaaaaagctt tgtctgcttc catggaaggt agcttgaatg ctaataatag 1620
 cttttccaat ggctactctg agcagattct caatgaagat gatagttcta atgcatcctt 1680
 cataaacact ctCGccgagT tCGatccctt cctccaaaca acgTTTTacc ctgagaatgA 1740
 gatgaatact acttctgatc tCGgtataga tCaggactac ttctcacatt ttctCGaaaa 1800
 tttcggcaac cataatgagg agcactacat gaatcataac tatggTcatg gtcttcttat 1860

ES 2 814 849 T3

gtcctatgtg tcccaagaag tctcatcaac tagcgttgat gatcaagaca atactaatga 1920
 gggttgggtca aattatcttc ttgaccatgc tgattttata catgacatgg attctgattc 1980
 cctcggaaag catctcatat gaatcttcgt gcctaagcag aaaggtttca aacttgtcag 2040
 aacaagaagt tatgtatgta ttctattata tggattgttt agtatatgtc caagatcatg 2100
 gttgttagtc ccaagtttag ggtttgtata atatacaata agggacgtta tcttataaaa 2160
 cgagg 2165

<210> 35
 <211> 2186
 <212> ADN
 <213> Brassica oleracea

5

<400> 35

gaaaatcaca gttcacgcct cttactccat gagcttctct attctcatcc tagtgttata 60
 atcttgcaaa cacatataga aagcaagggt tggagtgtac gagaaaaaca tgaaaacacc 120
 tagaagctct gtgggtgaga cccaagagcg tttctcgatt agtttcatat acagatgcat 180
 cagagttctc atcaaccgat ctacttcttt cttatcttat tagaagaaaa aaatcctatc 240
 aaaatttact ttctgcaag tatatTTTTt tttacatttt cattttcttg agtgttattt 300
 gagtgaagtt atattaaaat attgtaatag agttcatata tatcgaaaat gtcaagaaag 360
 ccatgttgtg tccggagaagg gctgaagaaa ggggcatgga ccaccgagga agataagaaa 420
 ctcatctctt acatccatga acatggagaa ggaggctggc gcgacattcc tcaaaaagct 480
 ggttaatatc tattatatat tttttggtaa atttttaaaa catatatatg tttgtttgg 540
 atttgatgta tgaaagtttt atggtgaata tgggtgtttta ctaggrttga aaagggtgtg 600
 aaagagttgt agactgcgat ggactaacta cctaaaacct gagatcaaaa gaggcgagtt 660
 tagttcagag gaggaacaga ttatcatcat gctccatgct gctcgtggca acaagtacgt 720
 ttattttaga ccaaaaaaaaa acaagtacgt ttatttttaa caaaaaggac gattatatat 780
 ttttatgtgt gtatggatcc tccagtgatc atcattctag ttttctcttt tttttatac 840
 cgcaaacaaa tttcattagt aaaaaaatta aaattccaaa gtcaatattc aaaaacacag 900
 tgttatatat ataatcctat atatgtcata tattaaaaaa gtacaacatg agaaatgaat 960
 ttaagtatgc ttctaaagcg aagttttact tcccgaaaaa ttattcttta ttttttcat 1020
 gtatttgaca attctctgat gcaaaatatg tgtttgatta gcaatatgtg actaaaaatt 1080
 gcaatagcac acatcatttt agtctctatt ccataaaaaa gtttcaaaat aaatttgatt 1140
 aactttggtc ttccatctta tctctttcac tattcttgtc tttaggtggg cggcatagc 1200
 kagacattta cctagaagaa cmgacaatga gatcaagaac tactggaaca cacatctcaa 1260
 gaaacgtttg atcgaacagg gtactgatcc cgtgactcac aagccactag cttctaatac 1320

10

ES 2 814 849 T3

aaaccctact	gtacctgaga	atitgcattc	cctagatgca	tctagtaatt	ccgacaagca	1380
atactcccgg	tcaagctcaa	tgcottocat	gtottgtact	ccttcctccg	gtttcaacac	1440
ggttttcgag	aataccagca	aagatgggac	accagttcgt	gaggacgatt	ccttgagtcg	1500
caagaaacgt	ttaagaaat	caagttctac	atcaaggctt	ttgaacaaag	ttgCGGctaa	1560
ggccacttcc	atgaaagaag	ctttgtctgc	ttccatggaa	ggtagtttga	atgctaatac	1620
aagcttttcc	aatggctact	ctgagcagat	tctcaatgaa	gatgatagtt	ctaatacatc	1680
cctcataaac	actctcgccg	agttcgatcc	cttcctccaa	acaacgtttt	accctgagaa	1740
tgagatgaat	actacttctg	atctcggtat	agatcaggac	tacttctcac	attttctcga	1800
aaatttcggc	agagatgatg	accacaatga	ggagcactac	atgaatcata	actatgggtca	1860
tgatcttctt	atgtccgatg	tgtcccaaga	agtctcatca	actagcgttg	atgatcaaga	1920
caatactaata	gagggttggt	caaattatct	tcttgaccat	gctgatttta	tacatgacat	1980
ggattctgat	tccctcgga	agcatctcat	atgaatcttc	gtgccaagc	agaaaggttt	2040
caaacttttg	aaacttgtca	gaacaagaag	ttatgtatgt	attctattat	atggattggt	2100
tagtatatgt	ccaagatcat	ggttgtagt	ccaagttta	gggtttgtat	aatatacaat	2160
aagggacggt	atcttataaa	acgagg				2186

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si el genotipo de una planta de hortaliza crucífera se asocia con un nivel aumentado de glucosinolato, que comprende obtener una muestra de ácidos nucleicos de dicha planta o una porción de la misma y detectar en dichos ácidos nucleicos un polimorfismo en el locus *Myb28* que está unido genéticamente a un nivel aumentado de glucosinolato, en donde el polimorfismo y el locus *Myb28* que confieren un rasgo de glucosinolato aumentado están genéticamente unidos y exhiben una puntuación LOD mayor de 3,0.
2. El método según la reivindicación 1 en donde la etapa de detección comprende la PCR.
3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde la determinación del genotipo comprende un ensayo codominante.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la etapa de detección comprende la hibridación de ADN.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el polimorfismo comprende al menos uno de:
- a) un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en una posición que corresponde al nucleótido 83, 136, 226, 563, 610, 830, 995, 1116, 1513, 1577, 1606, 1620, 1825, 1863, 1877 o 2026 de la SEQ ID NO: 1 o
 - b) un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1, o
 - c) un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 836 y 837, entre los nucleótidos 867 y 868 o entre los nucleótidos 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el polimorfismo comprende (a) al menos uno de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en una posición correspondiente al nucleótido 83, 136, 226, 563, 610, 830, 995, 1116, 1513, 1577, 1606, 1620, 1825, 1863, 1877 o 2026 de la SEQ ID NO: 1 o combinaciones de la misma; (b) una delección de uno o más de los nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1; (c) una delección de uno o más de los nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1; (d) una delección de al menos un nucleótido en una posición correspondiente al nucleótido 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 522, 523, 784, 785, 910, 911, 912, 913, 1366, 1367, 1368, 1812, 1813, 1814, 1815, 1816, 1817, 1818, 1819, 1820, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054 o 2055 de la SEQ ID NO: 1; (e) una delección de los nucleótidos en las siguientes posiciones: 324-331, 522-523, 784-785, 910-913, 1366-1368, 1812-1820 o 2047-2055 de la SEQ ID NO: 1 o combinaciones de los mismos; o (f) una inserción de uno o más nucleótidos entre los nucleótidos 836 y 837, 867 y 868 o 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1.
7. El método según la reivindicación 6 en donde (a) la inserción entre los nucleótidos 836 y 837 es de dos nucleótidos; (b) la inserción entre los nucleótidos 836 y 837 es de TT, (c) la inserción entre los nucleótidos 867 y 868 es de un nucleótido, (d) la inserción entre los nucleótidos 867 y 868 es A, (e) la inserción entre los nucleótidos 943 y 944 es de 13 nucleótidos o de hasta 13 nucleótidos o (f) la inserción entre los nucleótidos 943 y 944 es TATTA AAAAAGTA.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el polimorfismo se detecta mediante un método de cribado que comprende la utilización de al menos una primera secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende adicionalmente ensayar el fenotipo de una planta hortaliza crucífera para un nivel aumentado de glucosinolato.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el glucosinolato es 4-metilsulfonilbutil glucosinolato (MSB), 3-metilsulfonilpropil glucosinolato (MSP) o combinaciones de los mismos.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la planta hortaliza crucífera comprende al menos un glucosinolato en una cantidad de al menos 10 micromol/g de peso seco.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la planta de hortaliza crucífera

comprende 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB), 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) o combinaciones de los mismos en una cantidad de al menos 10 micromol/g de peso seco.

5 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la planta hortaliza crucífera es el brócoli.

10 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, cuyo método comprende adicionalmente la etapa de almacenar el resultado de la etapa de detección del polimorfismo en un medio legible por ordenador, en donde el genotipo de una planta o población de plantas para al menos un polimorfismo determinado en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 se almacena en un medio legible por ordenador.

15 15. Un método para producir una planta hortaliza crucífera que tiene niveles aumentados de glucosinolatos mediados por Myb28 mediante la transformación de una planta hortaliza crucífera con un gen myb28 que comprende la SEQ ID NO: 1 excepto por al menos un polimorfismo que está genéticamente unido a los niveles aumentados de glucosinolato, en donde el polimorfismo se selecciona del grupo que consiste en:

a) un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en una posición que corresponde al nucleótido 83, 136, 226, 563, 610, 830, 995, 1116, 1513, 1577, 1606, 1620, 1825, 1863, 1877 o 2026 de la SEQ ID NO: 1 o

20 b) un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 323 y 332, entre los nucleótidos 521 y 524, entre los nucleótidos 783 y 786, entre los nucleótidos 909 y 914, entre los nucleótidos 1365 y 1369, entre los nucleótidos 1811 y 1821 o entre los nucleótidos 2046 y 2056 de la SEQ ID NO: 1, o

c) un polimorfismo en el número de nucleótidos presentes entre los nucleótidos 836 y 837, entre los nucleótidos 867 y 868 o entre los nucleótidos 943 y 944 de la SEQ ID NO: 1.

25 16. El método según la reivindicación 15 en donde (a) la inserción entre los nucleótidos 836 y 837 es de dos nucleótidos; (b) la inserción entre los nucleótidos 836 y 837 es de TT, (c) la inserción entre los nucleótidos 867 y 868 es de un nucleótido, (d) la inserción entre los nucleótidos 867 y 868 es A, (e) la inserción entre los nucleótidos 943 y 944 es de 13 nucleótidos o de hasta 13 nucleótidos o (f) la inserción entre los nucleótidos 943 y 944 es TATTA AAAAAGTA y en donde la planta se transforma con un gen myb28 que comprende la SEQ ID NO: 24 o una secuencia que tiene al menos un 97 % (tal como al menos un 98 % o al menos un 99 %) de identidad con la SEQ ID NO: 24.

30 17. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende adicionalmente recoger la parte comestible de la planta hortaliza crucífera (por ejemplo, la inflorescencia de una planta de brócoli) producida por la planta.

35

ES 2 814 849 T3

FIG. 1

Las líneas de *B. oleracea* secuenciadas para crear este consenso son:
 GD33
 Línea del obtentor 560216
 Campo ID del obtentor número 2153.

Las líneas que contienen el alelo FT69 y que se utilizaron para crear este consenso son:
 Línea del obtentor 560526
 Línea del obtentor 580333
 Línea del obtentor BRM 51-1162
 Línea del obtentor BRM51-1210

```

FT69      1      GAAAAACACAGTTCACGCCTCTTACTCCATGAGCTTCTCTATTCTCATCC
Oleracea  1      GAAAAACACAGTTCACGCCTCTTACTCCATGAGCTTCTCTATTCTCATCC

FT69      51     TAGTGTATATAATCTTGCAAACACATATAGAAAGCAAGCTTTGGAGTGTAC
Oleracea  51     TAGTGTATATAATCTTGCAAACACATATAGAAAGCAAGCTTTGGAGTGTAC

FT69      101    GAGAAAAACATGAAAACACCTAGAAGCTCTGTGGGTAGACCCCAAGAGCG
Oleracea  101    GAGAAAAACATGAAAACACCTAGAAGCTCTGTGGGTAGACCCCAAGAGCG

FT69      151    TTTCTCGATTAGTTTCATATACAGATGCATCAGAGTTCTCATCAACCGAT
Oleracea  151    TTTCTCGATTAGTTTCATATACAGATGCATCAGAGTTCTCATCAACCGAT

FT69      201    CTACTTCTTTCTTATCTTATTAGAAATAAAAAATCCTATCAAATTTACT
Oleracea  201    CTACTTCTTTCTTATCTTATTAGAAATAAAAAATCCTATCAAATTTACT

FT69      251    TTCCTGCAAGTATATTTTCTTTACATTTTCATTTTCTTGAGTGTATTT
Oleracea  251    TTCCTGCAAGTATATTTTCTTTACATTTTCATTTTCTTGAGTGTATTT

FT69      301    GAGTGAAGTTATATTAATAATTTCTTTTGTTCATATATATCGAAAAT
Oleracea  301    GAGTGAAGTTATATTAATAATTTCTTTTGTTCATATATATCGAAAAT

FT69      351    GTCGAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGA
Oleracea  351    GTCGAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGA

FT69      401    CCACCGAGGAAGATAAGAAACTCATCTCTTACATCCATGAACATGGAGAA
Oleracea  401    CCACCGAGGAAGATAAGAAACTCATCTCTTACATCCATGAACATGGAGAA

FT69      451    GGAGGCTGGCGGACATTCTCAAAAAGCTGGTTAATATCTATTATATAT
Oleracea  451    GGAGGCTGGCGGACATTCTCAAAAAGCTGGTTAATATCTATTATATAT

FT69      501    TTTTGGTAAATTTTAAACATATATGTTTGTGGTATTGATGTA
Oleracea  501    TTTTGGTAAATTTTAAACATATATGTTTGTGGTATTGATGTA

FT69      551    TGAAAGTTTATATTGAATGTGGTGTTTACTAGGATTGAAAAGGTGTGG
Oleracea  551    TGAAAGTTTATATTGAATATGGTGTTTACTAGGRTGAAAAGGTGTGG

FT69      601    AAAGAGTTCTAGACTGCGATGGACTAACTAACCTAAAACCTGAGATCAAAA
Oleracea  601    AAAGAGTTCTAGACTGCGATGGACTAACTAACCTAAAACCTGAGATCAAAA

FT69      651    GAGGCGAGTTTAGTTTCAGAGGAGGAACAGATTATCATCATGCTCCATGCT
Oleracea  651    GAGGCGAGTTTAGTTTCAGAGGAGGAACAGATTATCATCATGCTCCATGCT

FT69      701    GCTCGTGGCAACAAGTACGTTTATTTTAGACCAAAAAAAAACAAGTACGT
Oleracea  701    GCTCGTGGCAACAAGTACGTTTATTTTAGACCAAAAAAAAACAAGTACGT

FT69      751    TTATTTTAAACAAAAGGACGATATATATTTTGTGTGTATGGATCC
Oleracea  751    TTATTTTAAACAAAAGGACGATATATATTTTGTGTGTATGGATCC

FT69      801    TCCAGTGATCATCATCTAGTTTCTCTTCTTTTATACCGCAAACA
Oleracea  801    TCCAGTGATCATCATCTAGTTTCTCTTCTTTTATACCGCAAACA

FT69      851    AATTTCAATTAGTAAAAAATTTAAAATTCCAAAGTCAATATTCAAAAACA
Oleracea  851    AATTTCAATTAGTAAAAAATTTAAAATTCCAAAGTCAATATTCAAAAACA

FT69      901    CAGTGTATATATATATCTATATATGTCATATATTAATAAGTATATT
Oleracea  901    CAGTGTATATATATATCTATATATGTCATATATTAATAAGTATATT
  
```

ES 2 814 849 T3

```

-----
FT69      951  AAAAAAGTACCAACATGAGAAATGAATTTAAGTATGCTTCTAAAGCGAAGT
Oleracea  951  AAAAAAGTACCAACATGAGAAATGAATTTAAGTATGCTTCTAAAGCGAAGT
-----
FT69      1001 TTTACTTCCCAGAAAAATTATTCCTTATTTTTTTTCATGTATTTGACAATTC
Oleracea  1001 TTTACTTCCCAGAAAAATTATTCCTTATTTTTTTTCATGTATTTGACAATTC
-----
FT69      1051 TCTGATGCAAAATATGTGTTTGATTAGCAATATGTGACTAAAAATTGCAA
Oleracea  1051 TCTGATGCAAAATATGTGTTTGATTAGCAATATGTGACTAAAAATTGCAA
-----
FT69      1101 TAGCACACATCATTTTAGTCTCTATTCCTATGAAAAGCTTCAAAATAAAT
Oleracea  1101 TAGCACACATCATTTTAGTCTCTATTCCTATGAAAAGCTTCAAAATAAAT
-----
FT69      1151 TTGATTAACCTTGGTCTTCCATCTTATCTCTTTCACTATTCCTGTCTTTA
Oleracea  1151 TTGATTAACCTTGGTCTTCCATCTTATCTCTTTCACTATTCCTGTCTTTA
-----
FT69      1201 GGTGGTCGGTCATAGCKAGACATTTACCTAGAAGAACMGACAATGAGATC
Oleracea  1201 GGTGGTCGGTCATAGCKAGACATTTACCTAGAAGAACMGACAATGAGATC
-----
FT69      1251 AAGAAYTACTGGAACACACATCTCAAGAAACGTTTGATCGAACAGGGTAC
Oleracea  1251 AAGAAYTACTGGAACACACATCTCAAGAAACGTTTGATCGAACAGGGTAC
-----
FT69      1301 TGATCCCGTGACTACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACTGTAC
Oleracea  1301 TGATCCCGTGACTACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACTGTAC
-----
FT69      1351 CTGAGAATTTGCATTCCTTAGATGCATCTAGCTTTCCGACAAGCAATAC
Oleracea  1351 CTGAGAATTTGCATTCCTTAGATGCATCTAGCTTTCCGACAAGCAATAC
-----
FT69      1401 TCCCGGTCAAGCTCAATGCCTTCCATGTCTTGTACTCCTTCCCTCCGGTTT
Oleracea  1401 TCCCGGTCAAGCTCAATGCCTTCCATGTCTTGTACTCCTTCCCTCCGGTTT
-----
FT69      1451 CAACACGGTTTTTCGAGAATACCAGCAAAGATGGGACACCAGTTCGTGAGG
Oleracea  1451 CAACACGGTTTTTCGAGAATACCAGCAAAGATGGGACACCAGTTCGTGAGG
-----
FT69      1501 ACGATTCCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTGAAGAAATCAAGTTCATACATCA
Oleracea  1501 ACGATTCCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTGAAGAAATCAAGTTCATACATCA
-----
FT69      1551 AGGCTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAAGAGCTTT
Oleracea  1551 AGGCTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAAGAGCTTT
-----
FT69      1601 GTCTGCTTCCATGGAAGGTACTTTGAATGCTAATAAAGCTTTTCCAATG
Oleracea  1601 GTCTGCTTCCATGGAAGGTACTTTGAATGCTAATAAAGCTTTTCCAATG
-----
FT69      1651 GCTACTCTGAGCAGATTCCTCAATGAAGATGATAGTTCTAATGCATCCCTC
Oleracea  1651 GCTACTCTGAGCAGATTCCTCAATGAAGATGATAGTTCTAATGCATCCCTC
-----
FT69      1701 ATAAACACTCTCGCCGAGTTCGATCCCTTCCCTCAAACAACGTTTACCC
Oleracea  1701 ATAAACACTCTCGCCGAGTTCGATCCCTTCCCTCAAACAACGTTTACCC
-----
FT69      1751 TGAGAATGAGATGAATACTACTTCTGATCTCGGTATAGATCAGGACTACT
Oleracea  1751 TGAGAATGAGATGAATACTACTTCTGATCTCGGTATAGATCAGGACTACT
-----
FT69      1801 TCTCACATTTTCTCGAAAATTCGGCAAGACATGATGACCAATGAGGAG
Oleracea  1801 TCTCACATTTTCTCGAAAATTCGGCAAGACATGATGACCAATGAGGAG
-----
FT69      1851 CACTACATGAATCATAACTATGGTCATGCTCTTCTTATGTCCATGTGTGTC
Oleracea  1851 CACTACATGAATCATAACTATGGTCATGCTCTTCTTATGTCCATGTGTGTC
-----
FT69      1901 CCAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGG
Oleracea  1901 CCAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGG
-----
FT69      1951 GTTGGTCAAATTATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGAT
Oleracea  1951 GTTGGTCAAATTATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGAT
-----
FT69      2001 TCTGATTCCTCGAAAAGCATCTCATATGAATCTTCGTGCCAAGCAGAA
Oleracea  2001 TCTGATTCCTCGAAAAGCATCTCATATGAATCTTCGTGCCAAGCAGAA
-----
FT69      2051 AGGTTTCAAACCTTTTGAACCTTCTCAGAACAAGAAGTTATGTATGTATTC
Oleracea  2051 AGGTTTCAAACCTTTTGAACCTTCTCAGAACAAGAAGTTATGTATGTATTC
-----
FT69      2101 TATTATATGGATTGTTTAGTATATGTCCAAGATCATGGTTGTTAGTCCCA

```

ES 2 814 849 T3

Oleracea 2101 TATTATATGGATTGTTTAGTATATGTCCAAGATCATGGTTGTAGTCCCA
FT69 2151 AGTTTAGGGTTTGTATAATATAACAATAAGGGACGTTATCTTATAAAACGA
Oleracea 2151 AGTTTAGGGTTTGTATAATATAACAATAAGGGACGTTATCTTATAAAACGA
FT69 2201 GG
Oleracea 2201 GG

FIG. 2a

(SEQ ID NO: 1)

Brassica oleracea Myb28

```

1   GAAATCAGTTCACGCCTTACTCCATGAGCTTCTCTATTCATCC
51  TAGTGTATAATCTTGCAAACACATATAGAAAGCAAGCTTTGGAGTGTAC
101 GAGAAAAACATGAAAAACCTAGAACCTCTGTGGTGGACACCCAAAGAGCG
151 TTTCTCGATTAGTTTCATATACAGATGCATCAGAGTTCTCATCAACCGAT
201 CTACTTCTTTCTTATCTTATTAGAAAGAAAAAATFCCTATCAAAATTTACT
251 TTCTGCAAGTATATTTTCTTTACATTTTCATTTCTTGAGTGTATTT
301 GAGTGAAGTTATAATTAATAATTTTAAATAGATTCATATATATCGAAAAAT
351 GTCAAGAAAGCCATGTTGTGTGCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGA
401 CCACCGAGGAAGATAAGAAACTCATCTCTTACATCCATGAACATGGAGAA
451 GGAGGCTGGCGCGACATTCCTCAAAAAGCTGGTAAATATCTATTATATAT
501 TTTTGGTAAATTTTAAACATATATATGTTTGTGGTATTGATGTA
551 TGAAAGTTTATGTTGAATATGGTGTTTACTAGGRTTGAAAGGTGTGG
601 AAAGAGTTCAGACTGCGATGGACTAACTACCTAAAACCTGAGATCAAAA
651 GAGGCGAGTTTAGTTCAGAGGAGGAACAGATTATCATCATGCTCCATGCT
701 GCTCGTGGCAACAAGTACGTTTATTTAGACCAAAAAAACAAGTACGT
751 TTATTTTAAACAAAAGGACGATTATATATTTTATGTTGTGTATGGATCC
801 TCCAGTGATCATCATTTCTAGTTTTCTCTTTTATACCGCAAAACAAA
851 TTTTATAGTAAAAAATTAATAATCCAAAGTCAATATCAAAAAACACAG
901 TGTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
951 AGAAATGAATTTAAGTATGCTTCTAAAGCGAAGTTTTACTTCCCAGAAAA
1001 TTATCTTTATTTTTTTCATGATTTGACAATTCCTCATGCAAAATATG
1051 TGTTTGATTAGCAATATGTGACTAAAAATGCAATAGCACACATCATTTT
1101 AGTCTCTATTCATATAAAGCTTCAAAATAAATTTGATTAACCTTTGGTC
1151 TTCCATCTTATCTCTTCACTATTTCTTGTCTTTAGGTGGTCCGTCATAGC
1201 KAGACATTTACCTAGAAGAACMGACAATGAGATCAAGAAGTACTGGAACA
1251 CACATCTCAAGAAACGTTTGATCGAACAGGGTACTGATCCCCTGACTCAC
1301 AAGCCACTAGCTTCTAATAACAACCTACTGTACTGAGAAATTTGCATTC
1351 CCTAGATGCATCTAGTATTTCCGACAAGCAATACTCCCGGTCAAGCTCAA
1401 TGCCCTCCATGCTTGTACTCCTTCCCTCCGGTTTCAACACGGTTTTTCGAG
1451 AATACCAGCAAAGATGGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCCCTGAGTCG
1501 CAAGAAACGTTTAAAGAAATCAAGTCTACATCAAGGCTTTTGAACAAAG
1551 TTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAAGAGCTTTGTCTGCTTCCATGGAA
1601 GGTACTTTGAATGCTAATAAAGCTTTTCCAAATGGCTACTCTGAGCAGAT
1651 TCTCAATGAAGATGATAGTTCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCG
1701 AGTTGATCCCTTCCCTCAAACAACGTTTTACCTGAGAATGAGATGAAT
1751 ACTACTTCTGATCTCGGTATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGA
1801 AAATTCGGCAGACATCATGACCAATGAGGAGCACTACATGAATCATA
1851 ACTATGGTCATGCTTCTTATGTCCTATGTGTCCTCAAGAAGTCTCATCA
1901 ACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGGGTTGGTCAAATATCT
1951 TCTTGACCATGCTGATTTATACATGACATGGATTCTGATTCCTCCGGAA
2001 AGCATCTCATATGAATCTTCTGTCCTAAGCAGAAAGGTTTCAAACCTTTTC
2051 AAACCTGTGTCAGAACAGAAGTTATGTATGTATTTATATATATGATGTT
2101 TAGTATATGTCCAAGATCATGGTGTGTAGTCCCAAGTTTAGGGTTGTAT
2151 AATATACAATAAGGGACGTTATCTTATAAAACGAGG
    
```

FIG. 2b

(SEQ ID NO: 2)

Brassica oleracea Myb28

```

1   GAAAATCACAGTTCACGGCCCTTACTCCATGAGCCTTCCTATTTCTCATCC
51  TAGTGTATATAATCTTGCRAACACATATAGRAAGCAACGTTTGGAGTGTAC
101 GAGAAACCATGAAACACCTGAAAGCTCTGTGGGTGAGADCCAAAGGCG
151 TTTCTCGATTAGTTTCATATACAGATGCATCAGAGTTCCTCATCAACCGAT
201 CTACTTCTTTCTTAINCTTATTAGAAAGAAAAAATCCATCAAAATTTACT
251 TTCCGCAAGTATATTTTTCTTTACATTTTCATTTTCTTGGAGCTTATTT
301 GAGTGAAGTTATATTAATAATTTGAAATAGGTTTCATATATATCGAAAT
351 GTCAGAAAGCCATGTTGTGTCCGGAGAAGGCTGAGAAAGGGGCATGGA
401 CCACCGAGSAAAGATAAGAAACTCATCTCTTACATCCATGAACATGGAGAA
451 GGAGGCTGGGCGCACCTTCTCAAAAAGCTGGTTAATATCTATTATATAT
501 TTTTGGTAAATTTTTTAAACATATATATGTTTGGTTGGTATTGATGTA
551 TGAAGTTTTATTTGAAATGCGTGTTTTACTAGGTTGAAAAGGTGGGG
601 AAAGAGTTGAGACTCCGATGGACTAATACCTAAACCTGAGATCAAAA
651 GAGCGAGTTTAGTTCCAGAGGAGGACAGATTATCATCATGCTCCATGCT
701 GCTCGTGGCAACAGTACGTTTATTTTAGCCAAAAAAAACAAAGTACGT
751 TTATTTTTAACAAAAGGACGATTTATATTTTTTGTGTGTATGGATCC
801 TCCAGTATCATCATCTAGTTTCTTTT<tt>ATACCGCAAAACA
851 AATTTCAATAGTAAAAAAA<a>TAAAAATCCAAAGTCAATATTCAAAACA
901 CAGTGTATATATATCTATATATATATATATATATATATATATATATAT
951 aaaaaagta>CAACATGGAATGAATTTAAGTATGCTCTTAAAGCGAAGT
1001 TTTACTTCCGAAAAATTTCTTTATTTTTTCTATGATTTTGACAATTC
1051 TCTGAGCAAAATATGTTGTTGATTAGCAATATGTGACTRAAAATTCAAA
1101 TAGCACACATCAATTTAGTCTCTATTCATAAAAAGCTTCAAAATAAAT
1151 TTGATTAACCTTTGGTCTCCATCTTATCTCTTCACTATCTTGTCTTTA
1201 GGTGGTGGTCAATAGCKAGACATTTACCTAGAAGACMGACAATGAGATC
1251 AAGAACTACTGGAACACACATCTCAAGAAACGTTTGAATGGAACAGGTAC
1301 TGATCCCGTGACTCACAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCTACTGTAC
1351 CTGAGAAATTTGCATTCCTAGATGCATCTAGTTCCGACAAAGCAATAC
1401 TCCCGGTCAAGCTCAATGCCCTCCATGCTTGTACTCCCTTCCCGGTTT
1451 CAACACGGTTTTCCAGATACCAGCAAGATGGGACACCAGTTCCGTGAGG
1501 ACGATTCCTTGAGTCCCAAGAAACGTTTGAAGAAATCAAGTTCTACATCA
1551 AGGCTTTGAAACAAAGTTGGCGCTAAGGCCACTTCCATGAAAGAGCTTT
1601 TTCTGCTTCCATGGAAGGTAGTTGAAATGCTAATGAAGCTTTTCCAATG
1651 GCTACTCTGAGCAGATTCTCAATGAAGATGATAGTTCTAATGCATCCCTC
1701 ATAAACACTCTCGCCGAGTTCCGATCCCTTCCCTCAAACACGTTTACCC
1751 TGAGAATGAGATGAATACTACTTCTGATCTCGGATAGATCAGGACTACT
1801 TCTCACATTTCTCGAAAAATTCGGCAGGATGTTGACCAATGAGGAG
1851 CACTACATGAATCATACTATGGTCTGTTCTTCTTATGTCCATGTGTCTC
1901 CCAAGAACTCTCATCACTAGCGTTGATGATCAAGACATACTAATGAGG
1951 GTTGGTCARATATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGAT
2001 TCTGATCCCTCGAAAGCATCTCATATGAATCTTCTGCTGAAAGCAGAA
2051 AGTTTCAAACTTTGAAACTTGTCAAGACAAAGCTTATGATGTATTC
2101 TATTATATGGATTTTATGATATATGCCAAGATCATGTTGTGTAGTCCCA
2151 AGTTTAGGTTTGTATATATACATAAGGGACGTTATCTTATAAAAAGA
2201 GG
    
```

FIG. 3

Expresión de MYB28 en hojas de cultivares de brócoli

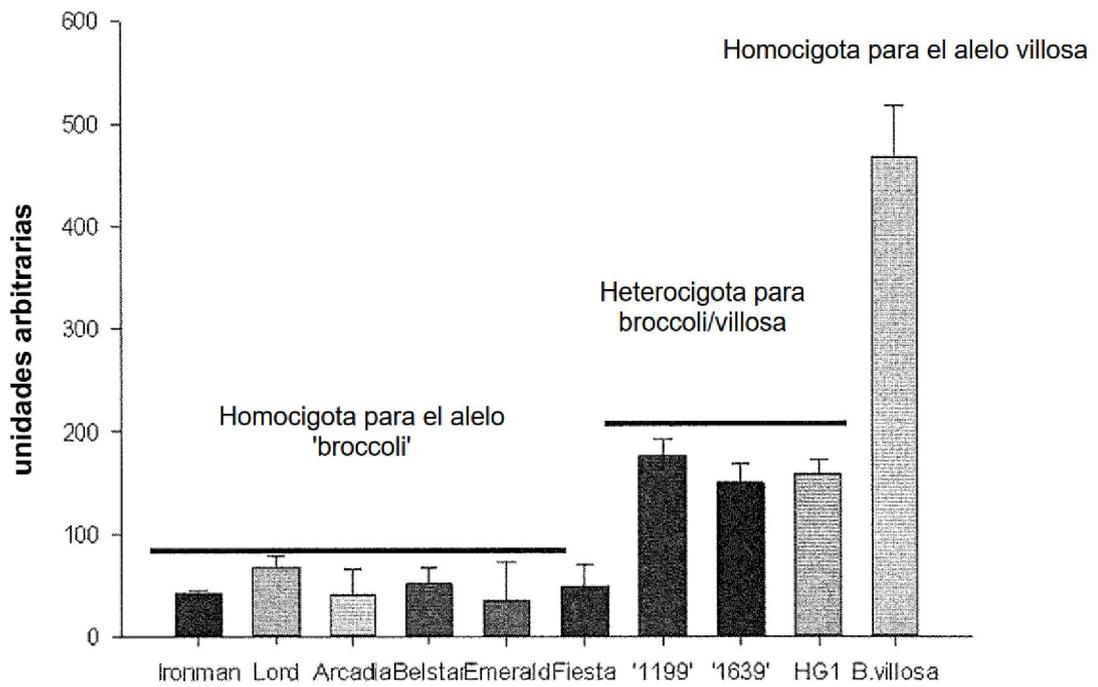


FIG. 4

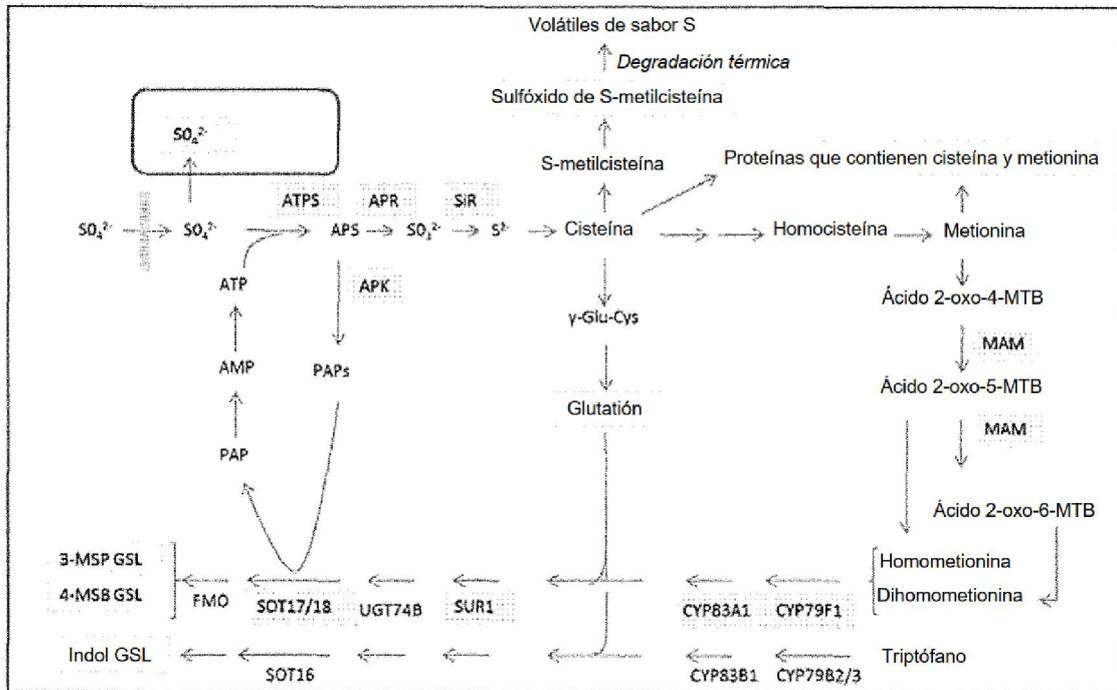


FIG. 5

(SEQ ID NO: 24 – FT69)

```

1   GAAAAFCACAGTTCACGCCTTACTCCATGAGCTTCTCTATTCTCATCC
51  TAGTGTTATAATCTTGCAAACACATATAGAAAGCAACATTTGGAGTGTAC
101 GAGAAAAACATGAAAACACCTAGAAAGCTCTGTGGGTAGACCCAAGAGCG
151 TTTCTCGATTAGTTTCATATACAGATGCATCAGAGTTCTCATCAACCGAT
201 CTACTTCTTTCTTATCTTATTAGAAAATAAAAAATCCTATCAAAATTTACT
251 TTCCTGCAAGTATATTTTTCTTTACATTTTCATTTTCTTGTAGTGTATTT
301 GAGTGAAGTTATATAAAATATTGTTTCATATATATCGAAAATGTCAAGAA
351 AGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGACCACCGAG
401 GAAGATAAGAAACTCATCTCTTACATCCATGAACATGGAGAAGGAGGCTG
451 GCGCGACATTCCTCAAAAAGCTGGTTAATATCTATTATATATTTTTGGT
501 AAATTTTAAAACATATATGTTTGTGGTATTGATGTATGAAAGTTTT
551 ATTTTGAATGTGGTGTTTACTAGGATTGAAAAGGTGTGGAAGAGATTGG
601 AGACTGCGATGGACTAACTACCTAAAACCTGAGATCAAAAGAGGCGAGTT
651 TAGTTCAGAGGAGGACAGATTATCATCATGCTCCATGCTGCTCGTGCCA
701 ACAAGTACGTTTATTTTAGACCAAAAAAACAAGTACGTTTATTTTTAA
751 CAAAAAGGACGATTATATATTTTTGTGTGTATGGATCCTCCAGTGATCAT
801 CATTCTAGTTTTCTCTTTTATTTTATACCGCAAACAATTTTCATTAGT
851 AAAAAAATTAATAATCCAAAGTCAATATCAAAAAACACAGTGTATATA
901 ATCCTATATATGTCATATATTAATAAAGTAAATTAATAAAGTAAACAACATG
951 AGAAATGAAATTAAGTATGCTTCTAAAGCGAAGTTTTACTTCCCATAAAA
1001 TTATTTCTTTATTTTTTTCATGTATTTGACAATCTCTGATGCAAAATATG
1051 TGTTTGATTAGCAATATGTGACTAAAAATGCAATAGCACACATCATTTT
1101 AGTCTCTATTCATATAAAAAGCTTCAAAATAAATTTGATTAACCTTTGGTC
1151 TTCCATCTTATCTCTTTCACTATTCTTGTCTTTAGGTGGTCCGTCATAGC
1201 KAGACATTTACCTAGAAGAACMGACAATGAGATCAAGAACTACTGGAACA
1251 CACATCTCAAGAACGTTTGATCGAACAGGGTACTGATCCCCTGACTCAC
1301 AAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCTACTGTACCTGAGAATTTGCATTC
1351 CCTAGATGCATCTAGTTCCGACAAGCAATACTCCCGTCAAGCTCAATGC
1401 CTTCCATGTCTGTACTCCTTCCCGGTTTCAACACGGTTTTTCGAGAAAT
1451 ACCAGCAAAGATGGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCCCTTGAGTCGCAA
1501 GAAACGTTTGAAGAAATCAAGTCTACATCAAGGCTTTGAACAAAGTTG
1551 CGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAATAAGCTTTGTCTGCTTCCATGGAAGGT
1601 AGTTTGAATGCTAATAAAGCTTTTCCATGGCTACTCTGAGCAGATTCT
1651 CAATGAAGATGATAGTTCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCGAGT
1701 TCGATCCCTTCTCCAAACAACGTTTTACCCTGAGAATGAGATGAATACT
1751 ACTTCTGATCTCGGTATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGAAAA
1801 TTTCGGCAACCAATAATGAGGAGCACTACATGAATCATAACTATGGTCATG
1851 TCTCTTATGTCCATATGTGTCCCAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGAT
1901 GATCAAGACAATACTAATCAGGGTTGGTCAAAATATCTTCTTGACCATGC
1951 TGATTTATACATGACATGGATTCTGATTCCTCGGAAAGCATCTCATAT
2001 GAATCTTCGTGCCATAAGCAGAAAGTTTTCAAACTTGTGAGAACAAAGAGT
2051 TATGTATGTATTCTATTATATGGATTGTTTAGTATATGTCCAAGATCATG
2101 GTTGTAGTCCCAAGTTTAGGGTTGTATAATATACAATAAGGGACGTTA
2151 TCTTATAAACGAGG
    
```

FIG. 6

