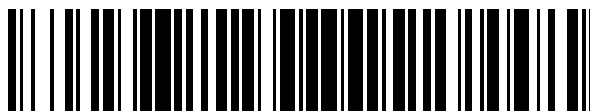


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 990**

51 Int. Cl.:

**A01H 1/02** (2006.01)  
**A01H 1/06** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**A01H 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2004 E 09175998 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **28.04.2010 EP 2179643**

54 Título: **Procedimiento de producción de líneas restauradoras doble cero de Brassica napus con un buen valor agronómico**

30 Prioridad:

**04.07.2003 EP 03291677**  
**08.12.2003 EP 03293057**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.02.2013**

73 Titular/es:

**INSTITUTE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (100.0%)  
147, RUE DE L'UNIVERSITE  
75007 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**PRIMARD-BRISSET, CATHERINE;  
DELOURME, RÉGINE;  
POUPARD, JEAN-PIERRE;  
HORVAIS, RAYMONDE;  
BUDAR, FRANÇOISE;  
PELLETIER, GÉORGES y  
RENARD, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 394 990 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**

Procedimiento de producción de líneas restauradoras doble cero de *Brassica napus* con un buen valor agronómico.

5 La invención se refiere a un procedimiento para producir líneas restauradoras doble cero de *Brassica napus* para esterilidad masculina citoplásmica Ogura (emc) que presentan una introgresión del rábano portadoras del gen restaurador Rfo suprimido del alelo Pgi-2 de rábano y recombinado con el gen PGI- 2 de *Brassica oleracea*, y que tiene un buen valor agronómico caracterizado por la fertilidad femenina, una buena tasa de transmisión de Rfo y un gran vigor vegetativo. La invención se refiere también a un procedimiento de formación de semillas híbridas de *Brassica napus* y su descendencia y para la utilización de marcadores para la selección.

10 Las líneas restauradoras de cultivo para el sistema de esterilidad masculina citoplásmica (emc) Ogu-INRA en semillas de colza (*Brassica napus* L.) ha sido un objetivo importante durante los últimos años. El retrocruzamiento común y el cultivo genealógico fueron necesarios para mejorar su fertilidad femenina y para obtener líneas restauradoras doble cero. Las denominadas variedades "doble cero" son las que tienen poco ácido erúcido en el aceite y pocos glucosinolatos en la harina sólida que queda tras la extracción del aceite. Sin embargo, algunas dificultades que aún se pueden encontrar en el cultivo de estas líneas (reestructuraciones por introgresión, posible enlace con rasgos negativos) debido al gran tamaño de la introgresión del rábano.

15 El objetivo en el contexto de la presente invención es el de proporcionar una nueva y mejorada línea restauradora doble cero con un buen valor agronómico.

Este objetivo se consigue mediante un nuevo procedimiento de producción de una línea restauradora doble cero recombinada para la emc Ogu-INRA en semillas de colza.

20 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de líneas restauradoras doble cero de *Brassica napus* para esterilidad masculina citoplásmica (emc) Ogura que presentan introgresión en el rábano portadoras del gen restaurador Rfo suprimido del alelo Pgi-2 del rábano y recombinado con el gen Pgi-2 de *Brassica oleracea*, y que tiene un buen valor agronómico caracterizado por la fertilidad femenina, una buena tasa de transmisión de Rfo y un gran vigor vegetativo, incluyendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- 25 a) cruzar líneas emc doble cero de *Brassica napus* primaveral que comprende una inserción suprimida de rábano con la línea doble cero de Drakkar primaveral para formar plantas heterocigóticas restauradas de *Brassica napus*,
- b) irradiar antes de la meiosis las plantas heterocigóticas restauradas obtenidas en la etapa a) con radiación de rayos gamma,
- 30 c) cruzar el polen de las flores obtenido en la etapa b) con la línea Wesroona de primavera emc doble cero,
- d) probar en la descendencia el vigor, la fertilidad femenina y la tasa de transmisión del gen emc,
- e) seleccionar líneas de descendencia.

En la presente invención, el término "línea(s)" significa una planta que es esencialmente homocigótica y que es reproducible por autopolinización.

35 Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la dosis de radiación en la etapa b) es 65 Gray durante 6 min.

Como ilustración del procedimiento según la presente invención, la línea emc doble cero de *Brassica napus* primaveral de la etapa a) es R211.

La R211 es una línea restauradora primaveral INRA.

La Drakkar es una variedad francesa de primavera registrada.

40 La Wesroona es una variedad australiana de primavera registrada.

Según una forma de realización ventajosa del procedimiento según la presente invención, la prueba se realiza con la combinación de cinco marcadores seleccionados de entre PGIol, PGIUNT, PGIint, BolJon y CP418.

45 La presente invención permite la obtención de líneas restauradoras doble cero de *Brassica napus* para Ogura emc que presentan una inserción Rfo suprimida del alelo Pgi-2 de rábano y recombinada con el gen Pgi-2 de *Brassica oleracea*, y que tiene un buen valor agronómico caracterizada por la fertilidad femenina, una buena tasa de transmisión de Rfo y un gran vigor vegetativo.

Ventajosamente, las líneas restauradoras doble cero presentan una combinación única de cinco marcadores seleccionados de entre PGIol, PGIUNT, PGIint, BolJon y CP418.

La presente invención permite la formación de una ilustración, plantas híbridas de *Brassica napus* y de su descendencia obtenidas por las etapas siguientes:

- a) proporcionar una línea restauradora producida según la reivindicación 1 y cultivada para ser homocigótica,
- b) utilizar dicha línea restauradora en un campo de producción de híbridos como el polinizador,
- 5 c) utilizar plantas estériles emc en un campo de producción de híbridos como la planta de productora de semillas híbridas, y
- d) recolectar la semilla híbrida de la planta masculina estéril.

Las semillas de la planta *Brassica* obtenidas por los procedimientos según la presente invención se describen también en la presente memoria.

- 10 En particular, en la presente memoria se describen las semillas de *Brassica napus* depositadas en NCIMB Limited, 23 St Machar Drive, Aberdeen, Escocia, AB24 3RY, Reino Unido, el 4 de julio de 2003, con el número de referencia NCIMB41183.

- 15 También se describe en la presente memoria la utilización de al menos cuatro marcadores PGIol, PGIint, BolJon y CP418, para la caracterización de líneas restauradoras recombinadas de *Brassica napus* para Ogura emc que presentan una inserción Rfo suprimida del alelo Pgi-2 de rábano y recombinada con el gen Pgi-2 de *Brassica oleracea*, y que tiene un buen valor agronómico caracterizado por la fertilidad femenina, una buena tasa de transmisión de Rfo y un alto vigor vegetativo.

Preferentemente, la combinación es de cinco marcadores PGIol, PGIUNT, PGIint, BolJon y CP418.

Dichos marcadores se representan en las siguientes figuras y en el listado de secuencias para la línea R2000.

- 20 Ventajosamente, dichos marcadores son los siguientes:

- El marcador PGIol que se amplía utilizando los cebadores: PGIol U y L PGIol:

(PGIol U: 5'TCATTTGATTGTTGCGCCTG3';

PGIol L: 5'TGTACATCAGACCCGGTAGAAA3')

- El marcador PGIint que se amplía utilizando los cebadores: PGIint U y PGIint L:

- 25 (PGIint U: 5'CAGCACTAATCTTGCGGTATG3';

PGIint L: 5'CAATAACCCTAAAAGCACCTG3')

- El marcador PGIUNT que se amplía utilizando los cebadores: PGIol U y PGIint L:

(PGIol U: 5TCATTTGATTGTTGCGCCTG3';

PGIint L: 5'CAATAACCCTAAAAGCACCTG3')

- 30 - El BolJon marcador que se amplía utilizando los cebadores: BolJon U y BolJon L:

(BolJon U: 5'GATCCGATTCTTCTCCTGTTG3';

BolJon L: 5'GCCTACTCCTCAAATCACTCT3')

- El marcador CP418 que se amplía utilizando los cebadores: SG129 U y L pCP418:

(SG129 U: cf. Giancola *et al.*, 2003 *Theor. Appl. Genet.* ( *en imprenta* )

- 35 pCP418 L: 5'AATTTCTCCATCACAAGGACC3')

Preferentemente, los marcadores utilizados en el procedimiento de la presente invención tienen las siguientes secuencias:

marcador PGIol R2000:

```

TCATTTGATT GTTGCGCCTG TCGCCTTGTT GTGTTATGAT GAATGAACAG CAGTCATTTA 60
ACATGTGGTT AACTTAACAG GGCCTCGGCT GTTGCAAAAC ACATGGTTGC TGTCAGCACT 120
AATCTTGGCG TATGAATTTG TGATTAATTTG TGTGTTGTTG TGACTCTTTC TTCATTGTTC 180
GTTTTCGTAC AATAAACCGA ATGTATAATC TTTTACAAA CTGAATTTTC TACCGGGTCT 240
GATGTACA                                     248
    
```

# ES 2 394 990 T3

marcador PGIUNT R2000:

```

TCATTGATT GTTGCGCCTG TCGCCTTGTT GTGTTATGAT GAATGAACAG CAGTCATTTA 60
ACATGTGGTT AACTTAACAG GGCTCCGGCT GTTGCAAAC ACATGGTTGC TGTCAGCACT 120
AATCTTGGCG TATGAATTTG TGATTAATTT TGTGTTGTTG TACTCTTTTTC TTCATTGTTC 180
GTTTTCGTAC AATAAACCGA ATGTATAATC TTTTACAAAC TGAATTTTCT ACCGGGCTCG 240
ATGTACAATG CTAGTCTCCA TGTTCTTGGG GATCATGATT TATTTTCTAC ATGTATTCAG 300
ACAGTACAGA AGAAAGTGT CAAAACCTCG GATGTTTTAA TTTACAGTTA GTGGAGAAGT 360
TCGGCATTGA TCCGAACAAT GCATTTGCAT TTTGGGACTG GGTGGGTGGA AGGTACAGTG 420
GTAAGTGCTT GTTTATTTGG TTGTATAAAT TTCTCGTCCA TTTCCGCTTG CTTAGTGTAT 480
AACTGAAATT CTTTTGCAGT TTGCAGTGCT GTTGGAGTCT TACCATTGTC TCTACAGTAT 540
GGCTTCTCTG TGGTTGAGAA GTACGGTACC TTCTACTTTA TCAGCCATCT CATAAAATGT 600
CTTAGGCATA TTCTTTCTAT TTTATTTCCC TCTTAATGAT TTCTTCTTTT TTTTATGCA 660
TTCCCGTTTT ATTTTCAAAA GTTGTACTG TCTCTAAATC AAGAAGAAAC CTTCTTAGTA 720
GATCCAGCTG ATATTCAGCC TTTTTTAAAT TGGACTGCAG GTTTTTAAAG GGGAGCTTCA 780
AGCATTCAGA AGCATTTCCA GTCCACACCG TTTGAGAAGA ATATACCCGT GAGTTGCAT 840
AGTTGTGTGA TTATACAGTT TTCTTGTCTT TTTGCTATGT CCATCAACAC TAGAGATTCG 900
TGAAGTTATT AGTGTAGTCA ACGCATAGGG AGAGGTGATT GGTGACTTTT GGACGATTC 960
AGGTGCTTTA GGGTTATTG
    
```

marcador PGIint R2000:

```

CAGCACTAAT CTTGCGGTAT GAATTTGTGA TTAATTTGT TTGTTTGTGA CTCTTTCTTC 60
ATTGTTCTGTT TCGTACAAT AAACCGAATG TATAATCTTT TACAAACTGA ATTTTCTACC 120
GGGTCTGATG TACAATGCTA GTCTCCATGT TCTTGGGGAT CATGATTTAT TTTCTACATG 180
TATTACAGACA GTACAGAAGA AAGTGTTCAA AACTCTGGAT GTTTTTAATTT ACAGTTAGTG 240
GAGAAGTTCG GCATTGATCC GAACAATGCA TTTGCATTTT GGGACTGGGT TGGTGAAGG 300
TACAGTGGTA AGTGCTTGT TATTTGTTG TATAAATTT TCGTCCATTT CCGCTTGCTT 360
AGTGTATAAC TGAATTTCTT TTGCAGTTG CAGTGCTGTT GGAGTCTTAC CATTGTCTCT 420
ACAGTATGGC TTCTCTGTGG TTGAGAAGTA CGGTACCTTC TACTTTATCA GCCATCTCAT 480
AAAATGTCTT AGGCATATTC TTTCTATTTT ATTTCCCTCT TAATGATTTT TTCTTTTTTT 540
TATTGCATTC CCGTTTTATT TTCAAAGTT GTTACTGTCT CTAATCAAG AAGAAACCTT 600
    
```

5

marcador BolJon R2000:

```

GATCCGATTC TTCTCCTGTT GAGATCAGCT CCAAACATCA AACAACTGT ACACAAATAT 60
CTTTACTTGC TAAATGGAAC ATGACAAGAG ATAGAAAATC FTGCTCATAG TATTGTACAA 120
GGGATAACAG GTAGAAAAC AAACCGTCTG TAAGATTTTC TCCCTGATCC TCTCACTTAA 180
CCAGTAGGCG TTTTTCACAT TGAAGCGCAT ATCTACTTTG GTATTCACTG AATAAAAAAA 240
GAAAGCTGGT AACATGTGAA GGATAACAA GCATTGATAC ACCAAGTAGT CACAAACTAC 300
ATTATAAAGG TCAGACCTTT GTTCACATTC TGGCCTCCAG GACCACCGCT TCTAGCAAAG 360
TTAAGCGTAA CATGGTCTGC ACGTATACAA ATGAAAATGT TTCTATCAA ATCCTATAAA 420
ATAGAGCTCT ATAACATTTG CGATACATAG TTTCACTAAC TCTGCAAGTA CTAACACAT 480
ATACAACAA AACTATGCGA ACAGATCAA ACTACTACAG AACACAGTTC TATGACACTG 540
TCGATAGTAA CATCCTCTGC AAGTACCAA GAGATAGCAA ATGAAACTAT GTAAACAAAT 600
CAAAATCTA AATTTCTCCA TCACAAGGAC CTACAGAATA GAGTTATCAT AACATTTTCT 660
GTAAATATTT CCATCAAAAT GACTAGAGAA CAGAGTTCTT ATAACATTAT CTGTAAATGT 720
TCCAACAAA CCACTACATA GCAGAGTTCT TATAACATTG TCTGTAATG TCCAATCAA 780
ACCACTACAG AACAAAGCTC CTATAACATT GTTATAACAA AGTTTCACTA AATCTACAAA 840
CTTTCCCGT AAATGAGCTT AATATCACCC AAAGATGTTT CAATCAGATA AAGAGTACGA 900
CATCGTTTTG AGATTAGAAC AAACGTAAAC TTACGTAGAG TGATTTGAGG AGTAGGC 957
    
```

marcador CP418L R2000:

```

AATTTCTCCA TCACAAGGAC CTACAGAATA GAGTTATCAT AACATTTTCT GTAAATATTT 60
CCATCAAAAT GACTAGAGAA CAGAGTTCTT ATAACATTAT CTGTAATGT TCCAACAAA 120
CCACTACATA GCAGAGTTCT TATAACATTG TCTGTAATG TCCAATCAA ACCACTACAG 180
AACAAAGCTC CTATAACATT GTTTATACAA AGTTTCACTA AATCTACAAA CTTTCCCGT 240
AAATGAGCTT AATATCACCC AAAGATGTTT CAATCAGATA AAGAGTAAAG ACATCGTTTT 300
GAGATTAGAA CAAACTGAAA CTTACGTAGA GTGATTTGAG GAGTAGGCTC GTTGCCAGCA 360
GAGCTAGCTC TCTCCTCCGC CTCATGAAGC ATCTGTTGCA CCTGAGACAA CCGTGACGAA 420
ACTTTCCGAT CACCGCCACC AGAATTCGAC GCCGCGCATC GGAAGGATCC GAATCGGGAA 480
CTGAGTGAAC CCGAGCGATC CCGGGAGTGC GACGGAGCGA TGGGAAAAGA GAGTGGCAGC 540
ATTTGACGCA AGAGTGAAG AGGAGAGGGT GGTGGATAAA CTCGCGTATG ATCAAGTTCG 600
TCATCGTCTT GATTCCCGCC ATTTTTTTTG TCAGGGCGCT CTGTGGCTTA GAAGTTTCCG 660
ATGCAATGA AC
    
```

En el dibujo adjunto a continuación, se utilizan las siguientes abreviaturas:

Dra.	Drakkar
Rel-15-1, E38, R15	R2000
Hete, Hel, R211.Drakkar	R211 heterocigótico* Drakkar

Darm	Darmor
Bol:	<i>Brassica oleracea</i>
Bra, B.rap:	<i>Brassica rapa</i>
GCPA18-A19, Wes, Aust:	Wesroona
Sam, SamIPGIolSunt5	Samourai
RRH1, ba2c	RRH1
rav, N.WR	<i>Brassica napus</i> híbrida * Rábano silvestre

- La figura 1 ilustra la irradiación con rayos gamma y la producción de F2.
- La figura 2 ilustra semillas colocadas en 'R211' y 'R2000'.
- La figura 3 muestra el número de semillas por vaina de diferentes líneas.
- La figura 4 ilustra la localización del cebador PGIol en el segmento de la secuencia de PGI de la base de datos. En esa figura:
  - PGIol: - cebador PGIol U (nombrado en SGAP: BnPGIch 1 U)
  - cebador PGIol L (nombrado en SGAP: Bn PGIch 1 L)
  - PGIint: - cebador PGIint U
  - cebador PGIint L (está fuera de la secuencia).
- La figura 5 ilustra la electroforesis en gel del gen PGI-2 (PGIol), marcador de RCP y SG34, marcador de RCP cerca de Rfo.
- La figura 6 ilustra el segmento Pgi-2 de ADN ampliado por RCP con cebadores PGIol.
- La figura 7 ilustra la digestión del producto de RCP PGIol por Msel.
 

En esa figura:

  - Sam y Darm tienen una banda de 75 pb.
  - Drak, R211.Dk y R2000 mostró una banda de 70pb (acrilamida al 15%).
  - 8 fue similar a Samourai (75 pb); la mezcla con Drakkar (70 pb) permitió la visualización de las dos bandas.
- La figura 8 ilustra la electroforesis en gel de agarosa del marcador PGIUNT.
 

En esa figura:

  - La banda PGIUNT (alrededor de 980 pb) está presente en *B. oleracea*, *B. rapa* cv (siglas en inglés de: variedad cultivada) Asko, líneas mantenedoras y restauradas, excepto en 'R211'.
  - No existe ampliación en el rábano ni en *Arabidopsis*.
  - En varios genotipos de *Brassica* sólo se amplió una banda. Los tamaños de las bandas son similares, pero las secuencias son diferentes.
- La figura 9 ilustra la electroforesis en gel del marcador PGIint de RCP.
 

En esta figura PGIint de la línea 7 de rábano es de aproximadamente 950 pb. Esta banda es la misma que en las RRH1 y R113 restauradas. No se encuentra en R211. Ninguna de las dos está en R2000. Sin embargo la banda PGIint es de un tamaño similar de aproximadamente 870 pb en las varias especies de *Brassica*, pero las secuencias son diferentes.
- La figura 10 ilustra la electroforesis en gel de agarosa del marcador BolJon de RCP.
- La figura 11 ilustra la electroforesis en gel de agarosa del marcador CP418.

En esta figura, la banda CP418 (de aproximadamente 670 pb) es específica para el genoma de *B. oleracea*. Está presente en *B. oleracea*, *B. napus* (Samourai, Drakkar, Pactol y la R2111\*Dk heterocigótica). Falta en la semilla de colza restaurada (RRH, R113 y R211). Está presente en la R2000 homocigótica.

- La figura 12 ilustra en la tabla resumen de marcadores.
- 5 - Las figuras 13 (a) y 13 (b) ilustran la alineación de la secuencia del marcador PGIol entre *Arabidopsis*, rábano, *B. rapa*, *B. oleracea* y R2000.
- Las figuras 14 (a), 14 (b), 14 (c) y 14 (d) ilustran la alineación de la secuencia del marcador PGIint-UNT entre *Arabidopsis*, rábano, *B. rapa*, *B. oleracea* y R2000.
- 10 - Las figuras 15 (a), 15 (b) y 15 (c) ilustran la alineación de la secuencia del marcador CP418L entre *Arabidopsis*, rábano, *B. rapa*, *B. oleracea* y R2000.
- Las figuras 16 y 16bis ilustran marcadores BolJon de *Arabidopsis*, rábano y *B. rapa*. Están alineados con las secuencias de *Arabidopsis* (DB AC007190fin-AC01 1000principio), las secuencias EMBH959102 final y EMBH448336 principio y de consenso representativas de *B. oleracea* de las bandas 1 y 2 de los marcadores SG129 en *B. napus* (en Drakkar y Samourai respectivamente).
- 15 Desde el punto de 836 pb, las secuencias AC07190-AC11000 y GCPATpBOJ ya no son íntimamente homólogas con las secuencias de *Brassica*.
- Las secuencias de rábano y *B. rapa* (GCPconsen RSRF BOJ y BR) son aún íntimamente homólogas con la de *B. napus*, desde el punto de 858 pb a los puntos de 900 y 981 pb, respectivamente.
- En el rábano, la única homología parcial se encuentra en la secuencia de *Brassica* más adelante.
- 20 En la especie *B. rapa* cv Asko, el lado izquierdo de su secuencia BolJon se puede alinear de nuevo, después de una supresión de 78 pb, con las de *B. oleracea* y *B. rapa* en *B. napus* desde el punto 1057 pb al cebador L de BolJon .
- Las figuras 17y17bis ilustran la localización de cebadores Pgi-2 en la secuencia MJB21.12 de *Arabidopsis thaliana*.
- 25 - La figura 18 ilustra la localización de cebadores BolJon en el gen mipsAtl62850 y área de solapamiento de los clones AC007190 y AC011000 de *Arabidopsis thaliana*. Se presenta la alineación con el producto de RCP BolJon de *Arabidopsis* (740 pb).

Debe apreciarse, sin embargo, que los ejemplos son proporcionados únicamente a título ilustrativo no limitativo del objeto de la invención.

- 30 **Ejemplo I: Procedimiento de producción de una línea restauradora doble cero de *Brassica napus* para emc Ogura que presenta una introgresión de rábano, que lleva el gen restaurador Rfo suprimido del alelo Pgi-2 de rábano y recombinado con el gen Pgi-2 de *Brassica oleracea*, y que tiene un buen valor agronómico caracterizado por la fertilidad femenina, una buena tasa de transmisión de Rfo y un gran vigor vegetativo.**

Materiales y procedimientos:

- 35 Genotipos: La línea 'R211' con una inserción de rábano suprimida se cruzó con semillas de colza 'Drakkar' con pocos glucosinolatos (GLS) para producir una descendencia F1 ('R211\*Dk'). La línea 'Wesroona' (de origen australiano) de emc con pocos GLS se utilizó para los cruces siguientes. Se utilizaron como controles en análisis moleculares: las líneas de invierno restauradas proceden de 'Samourai' que lleva la introgresión completa ('RRH1') o incompleta ('R113') así como la línea 7 de rábano europeo, D81 de rábano asiático restaurada, híbrido *Brassica napus*\*rábano silvestre, *Brassica oleracea* y *B. rapa* cv Asko, *Arabidopsis thaliana*.
- 40

Irradiación con rayos gamma: Plantas con floración completa se trataron con rayos gamma procedentes de una fuente de Co60 en un área controlada. Se aplicó una dosis subletal de 65 Gray antes de la meiosis.

- 45 Cruzamientos de prueba y de producción de F2: Las plantas irradiadas se transfirieron a un invernadero protegido contra insectos después de la eliminación de brotes de florales mayores de 2 mm. La descendencia F1 irradiada se utilizó para polinizar manualmente la línea 'Wesroona' de emc. Las plantas derivadas de F1' restauradas se dejaron para producir familias F2 recolectadas una a una y sembradas con precisión en un ensayo de campo junto con las referencias no irradiados (La figura 1).

Selección fenotípica: Se puntuaron tres criterios visuales (en una escala de 1 a 5) más de 2 años en ensayos de campo, en 1200 descendientes de F2 más 44 referencias (82.330 plantas citadas):

50

- 1 - Vigor vegetativo,
- 2 - Normalidad de la proporción de plantas fértiles/estériles en la segregación de F2, y
- 3 - Fertilidad femenina (desarrollo de las vainas y del conjunto de semillas).

5 Se obtuvieron generaciones autopolinizadas avanzadas de las familias seleccionadas ya sea en campo o invernadero y se produjeron líneas homocigóticas (F4) para su posterior análisis.

El análisis de isoenzimas se realizó como en Delourme R. y Eber F. 1992. *Theor. Appl. Genet.* 85: 222-228, desarrollo de marcador en Fourmann M. *et al.* 2002. *Theor. Appl. Genet.* 105:1196-1206. Los productos de RCP se validan mediante secuenciación. Las alineaciones se realizaron utilizando Blast Ncbi y Uk Crop Net Brassica DB y el programa informático INRA Toulouse de Multialin.

#### 10 Procedimiento:

Se selecciona una línea hiporrestauradora homocigótica de primavera GLS, 'R211', que presenta ya supresiones en la introgresión (Delourme R. y Eber F. 1992. *Theor. Appl. Genet.* 85: 222-228. Delourme R. *et al.* 1998. *Theor. Appl. Genet.* 97: 129-134. Delourme R. *et al.* 1999. *10<sup>th</sup> Int. Rapeseed Congress*, Camberra). Varios marcadores moleculares faltan en ambos lados del Rfo, tales como spATCHIA (Fourmann M. *et al.* 2002. *Theor. Appl. Genet.* 105:1196-1206), spSG91 (Giancola S. *et al.* 2003 *Theor. Appl. Genet.* (en imprenta)). La 'R211' perdió la expresión de isoenzimas del alelo PGI-2 del gen de rábano, pero también la del alelo Pgi-2 del genoma de *B. oleracea* (1,2). Por otra parte, la 'R211' homocigótica muestra rasgos negativos vinculados tales como poco vigor y muy poca producción de semillas. Los autores supusieron que estas plantas carecen de un segmento cromosómico de colza. La proporción fértil en las descendencias F2 procedentes de este material es menor de lo esperado (64% en lugar del 75%). Los autores iniciaron el programa de esta línea 'R211' y trataron de forzar la recombinación entre el Rfo que lleva introgresión de esta línea suprimida y el cromosoma homólogo de colza de una línea *B. napus* doble cero.

Se sabe que la radiación ionizante provoca reestructuraciones cromosómicas por las roturas de doble cadena seguidas de reunión anómala de los extremos. Se utilizó irradiación con rayos gamma en una F1 heterocigótica derivada de la línea 'R211' para provocar roturas cromosómicas, justo antes de la meiosis, para una recombinación de la introgresión suprimida de rábano en el genoma de colza.

#### 25 Resultados:

Muy pocas familias tenían la mejor puntuación en los tres criterios de cada una de las 1200 familias F2 probadas.

Sólo una, 'R2000', se ha demostrado que produce una proporción normal de plantas fértiles por descendencia autopolinizada con una regeneración estable de buenas características agronómicas tales como una buena fertilidad femenina, con una producción normal de semillas en comparación con 'R211' (Figs. 2 y 3). Esta familia se obtuvo a partir de un tratamiento de irradiación de 6 min a un caudal dosis de 65 Gray por hora.

El análisis de glucosinolato confirmó su bajo contenido.

En la figura 2 (producción de semillas en "R211" y "R2000") R2000 presentaba inflorescencias normales, con una arquitectura de aspecto normal.

35 En la figura 3 (Número de semillas por vaina), se observa:

- en las mejores familias F4 de "R2000" en autopolinización (autofecundaciones) y en cruzamientos de prueba,
- en la línea emc de 'Pactol' en colza y referencias de 'R211'.

#### **Ejemplo II: Selección de marcadores en el gen Pgi-2**

40 Análisis de isoenzimas PGI: La descendencia de "R2000" expresó el alelo Pgi-2 de la colza de del genoma de *B. oleracea*, originalmente perdido en 'R211'.

Se definieron tres marcadores de RCP para caracterizar la familia R2000 en comparación con las semillas de colza RRH1 y R113 restauradoras conocidas.

- 1) El marcador PGIol se desarrolló a partir de las secuencias de BrassicaDB para que sean específicas para el genoma de Brassica. No existe ninguna ampliación en el rábano ni en *Arabidopsis th.*, sino solamente en Brassica, con una banda de 248 pb.
- 2) El marcador PGIint amplió una parte más larga del gen Pgi-2, lo que permite una clara distinción entre las diversas especies probadas *Brassica*, *Raphanus* y *Arabidopsis*. Las especies *B. rapa* y *B. oleracea* no se distinguían por el tamaño de la banda en gel de agarosa, sino por su secuencia PGINT en la banda.

- 3) Marcador PGIUnt, una combinación de los cebadores PGIol U y PGI int L. Este marcador tenía la especificidad del marcador PGIol pero ampliando una parte más larga como para PGIint.

#### II.1 Marcador PGIol

- 5 Con los cebadores PGIol, la línea paterna 'R211' no presentó ampliación, mientras que las líneas de primavera probadas presentaron una banda de 248 pb. Su secuencia de ADN es homóloga a las secuencias de PGI-2 de la Crop Net UK DB en especies de *Brassica* y desde el trabajo anterior del grupo de los autores (denominadas secuencias SGAP) (Localización de los cebadores SG PGI chou, figura 4).

Era ortólogo del clon MJB21-12, en el cromosoma V, (34543 pb) en *Arabidopsis* (NCBI DB).

PGIol más SG34 para montar una prueba de homocigocidad:

- 10 La utilización combinada de dos conjuntos de cebadores de en una mezcla RCP, marcando PGIol el gen Pgi-2 ausente en la planta homocigoto restaurada y SG34 (de S. Giancola *et al.*, Giancola S. *et al.*, 2003 *Theor. Appl. Genet. (en imprenta)*), un marcador muy cerca del gen Rfo, se creó para distinguir plantas homocigóticas de heterocigóticas entre las plantas fértiles que segregan en descendencias F2 derivadas de 'R211'. En lugar de utilizar SG34, es posible utilizar cualquier otro marcador cerca del gen CER o en el mismo.

- 15 Sólo una familia R2000 no presentaba ninguna diferencia entre descendientes de homocigotos y heterocigotos:

El gen Pgi-2 está presente en el homocigoto R2000, que no es el caso para el R211 homocigótico paterno.

En la figura 5 (marcadores PGIol y SG34 de RCP):

La familia "R2000" homocigótica ha restaurado la banda PGIol.

- 20 La secuencia de ADN de la banda confirmó la homología con la secuencia Pgi-2 de *Arabidopsis* y *Brassica* conocida. Los genotipos de referencia (Drakkar, Pactol y Samourai, Darmor) tenían el mismo patrón en el gel. La secuencia de esta banda común permitió confirmar su gran homología ya que eran casi similares, salvo en la sustitución de la base.

La familia "R2000" homocigótica ha restaurado la banda PGIol del tipo *Brassica oleracea*. Era distinta de la del restaurador conocido del grupo Samourai.

- 25 Esta parte ampliada de la PGI-2 está muy conservada y casi no se mostraban diferencias entre los distintos genotipos. Se investigó una parte más larga del PGI-2 gen.

#### II.2 Marcadores PGIUNT y PGIint

Patrones de electroforesis de productos de RCP:

- 30 Marcador PGIUNT: Se diseñó un segundo cebador inverso, PGIint L, corriente abajo de la secuencia Pgi-2, para ampliar regiones del gen tan bien conservadas y tan variables. Cuando se utiliza con el cebador PGIol U, amplía una banda de 980 pb sólo en los genomas de *Brassica*. R211 no mostró ninguna banda. El "R2000" homocigótico mostró la banda PGIUNT como en el Drakkar paterno.

En la figura 8 (marcador PGIUNT):

- 35 El marcador PGIint amplificó un segmento de PGIUNT. El cebador superior PGIint permite la ampliación en todas las especies estudiadas, lo que permite una clara distinción entre *Arabidopsis*, rábano y *Brassica*. *B. rapa* y *B. oleracea* no se distinguieron por el tamaño de la banda en gel de agarosa, sino por su secuencia PGIint. Todos los genotipos probados restaurados, excepto la línea 'R211', mostraban la banda de rábano europeo y una banda de *Brassica*, homóloga una de *B. rapa*.

- 40 La "R2000" homocigótica no mostró la banda PGIint de rábano, como en la línea paterna 'R211' suprimida, pero mostró una banda de *Brassica*, homóloga a una de *B. oleracea*.

La electroforesis de marcador se representa en PGIintla figura 9.

Análisis de la secuencia:

Comparación de las secuencias de PGI de las bases de datos.

Se conoce un segmento de PGI de aproximadamente 490 pb.

- 45 Las secuencias de un segmento de aproximadamente 490 pb de diferentes genotipos (*B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus*) se han estudiado en el grupo de laboratorio de los autores y se dieron algunas secuencias a *Brassica* Crop Net DB: Emaf25875 a 25788 por M. Fouramnn (4). Estas secuencias están muy conservadas.



Comparación de las secuencias de PGI de las especies *B. rapa* y *B. oleracea* (figuras 13 y 14):

La comparación entre las secuencias de PGI que se ha obtenido de los genotipos probados de las especies *B. oleracea* y *B. rapa*, demostró que eran distintos por sustituciones de 21 bases. Estas sustituciones permitieron distinguir secuencias PGI de los otros genotipos probados de colza, homólogos a *B. rapa* cv Asko (RRH1 y R113) o *B. oleracea* (Drakkar, R211\*DK pero también R2000).

Ejemplo III: Selección de marcador en una región cerca de Rfo

Se determinaron los marcadores que rodean el gen Rfo en la inserción de rábano con objeto de facilitar la clonación del gen Rfo (Desloires S. *et al.*, 2003 EMBO reports 4, 6:588-594). Uno de estos, el marcador SG129 de RCP se situó muy cerca de Rfo (Giancola S. *et al.*, 2003 *Theor. Appl. Genet. (en imprenta)*): se coamplificaron distintas bandas en genomas de *B. oleracea* y *B. rapa* de *B. napus*, pero la banda de rábano resultaba difícilmente visible en un gel de agarosa.

La secuencia diana SG129 era ortóloga de un clon (AC011000, en el locus F16P17) en *Arabidopsis thaliana*. Este clon se superpuso a un clon contiguo adyacente a *Arabidopsis* (AC07190).

A partir de Brassica Crop Net DB, se descubrió un clon de *B. oleracea*, (EMB448336, 764 pb) que arremete contra el comienzo de la A011000, y un segundo clon de *B. oleracea* (EMB53971), distante de aproximadamente 300 pb en la cartografía de *Arabidopsis*, que arremete contra el fin de AC07190.

Se diseñó un nuevo marcador de RCP, BolJon, entre los dos clones de *B. oleracea*. Se verificó que permitía la ampliación de bandas específicas de RCP en los diferentes genotipos comparados en la presente memoria.

En la figura 16 (Gel de electroforesis de los productos de RCP BolJon):

- En *Arabidopsis*, se amplió una banda BolJon de 815 pb, homóloga al segmento de solapamiento de los contiguos.
- En las especies diploides de *Brassica*, el marcador BolJon presentaba distintas bandas: una de 950 pb en *B. oleracea* y otra de 870 pb en *B. rapa*. Se demostró que los dos clones de *B. oleracea* (EMB53971 y EMB448336) están en continuidad de secuencia en el genoma de *Brassica* como lo está para las secuencias ortólogas en *Arabidopsis*.
- En *B. napus*, estas dos bandas se coamplificaban en las líneas mantenedoras, Samourai o Drakkar.
- En la línea 7 de rábano, se amplió una banda BolJon de aproximadamente 630 pb de longitud. La banda de la emcRd81 de rábano restaurado fue ligeramente menor.
- En todas las líneas de colza restauradas, una de las bandas BolJon era del mismo tamaño que la línea 7 de rábano. El BolJon es un marcador de la introgresión de rábano.
- Las líneas homocigóticas de colza restauradas, 'RRH1', 'R113' y también 'R211', sólo presentaban la banda de *B. rapa* y la banda de rábano de 630 pb pb lo que sugiere que la ortóloga de *B. oleracea* del gen diana falta o ha sido modificada cuando el segmento en el rábano de cromosoma se insertó en el genoma constitutivo de *B. oleracea* de colza.
- Plantas de homocigotos "R2000" presentaban BolJon para RCP en rábano, además las dos bandas de BolJon en Brassica, que han restaurado de nuevo la de *B. oleracea*, perdida en 'R211' y otras líneas restauradoras.
- Los autores diseñaron un cebador, pCP418L, específico del genoma de *B. oleracea* en la especie estudiada. Con el cebador SG129U se amplió solamente una sola banda de RCP (670 pb) en la especie *B. oleracea* (figura 17).
- No se produjo ampliación en *B. rapa*, en el rábano, ni en *Arabidopsis*, pero no existía una banda CP418 clara en líneas mantenedoras de *B. napus*. Su secuencia era estrictamente homóloga a la secuencia EMB448336. Este marcador estaba en una secuencia de ADN muy conservada que no permite no polimorfismo entre genotipos, excepto por presencia / ausencia.
- En RRH1, R113 y en R211 no había banda CP418, lo que indica como anteriormente que el ortólogo de *B. oleracea* del gen diana falta o ha sido modificado después de la inserción de rábano.
- Plantas con homocigotos 'R2000' presentaban la banda CP418, que ha restaurado de nuevo la específica de *B. oleracea*.

En la presente invención, una nueva línea hiporrestauradora recombinada en GLS se ha seleccionado con una buena fertilidad femenina. El valor pequeño de la línea 'R211' permitió la selección en el campo de un caso de recombinación rara y caracterización de la familia "R2000".

5 La 'R2000' homocigótica presenta una combinación única de los marcadores PGIol, PGIUNT, PGIint y BolJon cuando se compara con el restaurador de colza ya analizado: el marcador PGIint demostró que las líneas homocigóticas de colza restauradas, RRH1 y R113 presentaban la banda de rábano europeo más una banda de *Brassica*, homóloga al genoma de *B. rapa*. La 'R2000' no presenta ninguna banda de rábano, perdida como en su línea paterna R211 suprimida, pero presentaba una banda de *Brassica* homóloga a *B. oleracea*. La secuencia PGIint ortóloga en su genoma de *B. rapa* no está ampliada con este marcador en el fondo genético de R211 y Drakkar.

10 Las secuencias del marcador PGIol y del marcador PGIUNT en líneas restauradas RRH1 y R113 eran homólogas a las de *B. rapa* cv Asko. En 'R2000', la secuencia PGIUNT es homóloga a la de *B. oleracea*. La secuencia PGIunt ortóloga en su genoma de *B. rapa* no está ampliada con este marcador en el fondo genético de R211 y Drakkar.

15 El marcador BolJon demostró que las líneas homocigóticas de colza restauradas, incluyendo la 'R211' presentaba la banda de rábano europeo, más sólo la de *B. rapa*. 'R2000' presenta las dos bandas de 'R211', más la banda BolJon de *B. oleracea* restaurada.

El marcador CP418 demostró que 'R2000' regeneró este segmento conservado de *B. oleracea*.

20 La hipótesis de los autores es que un episodio de recombinación tuvo lugar en la célula madre del polen que dio lugar a las plantas "R2000". La introgresión de rábano suprimida se integró a continuación al segmento de cromosoma homólogo normal, que lleva el gen Pgi-2 del tipo *B. oleracea* y la secuencia diana BolJon, caracterizada por estos marcadores, probablemente del genoma "00" de Drakkar presente en el "R211\*DK" heterocigótico irradiado.

El patrón observado para BolJon sugiere que el episodio de recombinación produjo una región duplicada concreta, una de rábano y una de *B. oleracea*, en la familia 'R2000'.

#### Listado de secuencias

- 25 <110> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)  
 <120> Procedimiento de producción de líneas restauradoras doble cero de *Brassica napus* con buen valor agronómico  
 <130> D21413  
 <140> EP 04744142.3
- 30 <141> 2004-07-05  
 <150> EP 03291677.7  
 <151> 2003-07-04  
 <150> EP 03293057.0  
 <151> 2003-12-08
- 35 <160> 5  
 <170> PatentIn versión 3.2  
 <210> 1  
 <211> 248  
 <212> ADN
- 40 <213> *Brassica napus*  
 <220>  
 <223> Marcador PGIol1  
 <400> 1

ES 2 394 990 T3

tcatttgatt	gttgcgcctg	tcgccttgtt	gtgttatgat	gaatgaacag	cagtcattta	60
acatgtgggt	aacttaacag	ggctccggct	gttgcaaac	acatggttgc	tgtcagcact	120
aatcttgccg	tatgaatttg	tgattaaatt	tgtttgtttg	tgactctttc	ttcattgttc	180
gttttcgtac	aataaaccca	atgtataatc	ttttacaaa	ctgaattttc	taccgggtct	240
gatgtaca						248

<210> 2

<211> 979

<212> ADN

5 <213> Brassica napus

<220>

<223> Marcador PGI-UNT

<400> 2

tcatttgatt	gttgcgcctg	tcgccttgtt	gtgttatgat	gaatgaacag	cagtcattta	60
acatgtgggt	aacttaacag	ggctccggct	gttgcaaac	acatggttgc	tgtcagcact	120
aatcttgccg	tatgaatttg	tgattaaatt	tgtttgtttg	tgactctttc	ttcattgttc	180
gttttcgtac	aataaaccca	atgtataatc	ttttacaaa	tgaattttct	accgggtctg	240
atgtacaatg	ctagtctcca	tgttcttggg	gatcatgatt	tattttctac	atgtattcag	300
acagtacaga	agaaagtgtt	caaaactctg	gatgttttaa	tttacagtta	gtggagaagt	360
tcggcattga	tccgaacaat	gcatttgcag	tttgggactg	ggttggtgga	aggtagcagt	420
gtaagtgcct	gtttatttgg	ttgtataaat	ttctcgtcca	tttccgcttg	cttagtgtat	480
aactgaaatt	cttttgcagt	ttgcagtgct	gttggagtct	taccattgtc	tctacagtat	540
ggcttctctg	tggttgagaa	gtacgggtacc	ttctacttta	tcagccatct	cataaaatgt	600
cttaggcata	ttctttctat	tttatttccc	tottaatgat	ttcttctttt	ttttattgca	660
ttcccgtttt	attttcaaaa	gttgttactg	tctctaaaatc	aagaagaaac	cttcttagta	720
gatccagctg	atattcagcc	ttttttaaat	tggactgcag	gtttttaaag	gggagcttca	780

agcattgata	agcatttcca	gtccacaccg	tttgagaaga	atatacccgt	gagttgcatt	840
agttgtgtga	ttatacagtt	ttcttgtcct	tttgctatgt	ccatcaacac	tagagattcg	900
tgaagtatt	agtgtagtca	acgcataggg	agaggtgatt	ggtgactttt	ggacgatttc	960
aggtgcttta	gggttattg					979

10

<210> 3

<211> 866

<212> ADN

<213> Brassica napus

15

<220>

<223> Marcador PGI-int

<400> 3

cagcactaat	cttgcggtat	gaatttgtga	ttaaatttgt	ttgtttgtga	ctctttcttc	60
attgttcggt	ttcgtacaat	aaaccgaatg	tataatcttt	tacaaactga	atcttctacc	120
gggtctgatg	tacaatgcta	gtctccatgt	tcttggggat	catgatttat	tttctacatg	180
tattcagaca	gtacagaaga	aagtgttcaa	aactctggat	gttttaattt	acagttagtg	240
gagaagttcg	gcattgatcc	gaacaatgca	tttgcathtt	gggactgggt	tgggtggaag	300
tacagtggta	agtgttgggt	tatttgggtg	tataaatttc	tcgtccattt	ccgcttgctt	360
agtgtataac	tgaattctct	ttgcagtttg	cagtgtctgt	ggagtcttac	cattgtctct	420
acagtatggc	ttctctgtgg	ttgagaagta	cggtaccttc	tactttatca	gccatctcat	480
aaaatgtctt	aggcatatct	tttctathtt	atctccctct	taatgatttc	ttcttttttt	540
tattgcattc	ccgtttttatt	ttcaaaagtt	gttactgtct	ctaaatcaag	aagaaacctt	600
cttagtagat	ccagctgata	ttcagccttt	tttaaatgg	actgcagggt	tttaaagggg	660
agcttcaagc	attgataagc	atctccagtc	cacaccgttt	gagaagaata	tacccttgag	720
ttgcattagt	tgtgtgatta	tacagttttc	ttgtcttttt	gctatgtcca	tcaacactag	780
agattcgtga	agttattagt	gtagtcaacg	catagggaga	ggtgattggg	gacttttggg	840
cgatttcagg	tgccttaggg	ttattg				866

<210> 4

<211> 957

<212> ADN

<213> Brassica napus

5 <220>

<223> Marcador BolJon

<400> 4

gatccgattc	ttctcctggt	gagatcagct	ccaaacatca	aacaacttgt	acacaaatat	60
ctttacttgc	taaattggaac	atgacaagag	atagaaaatc	ttgctcatag	tattgtacaa	120
gggataacag	tgtagaaaac	aaaccgtctg	taagattttc	tccctgatcc	tctcacttaa	180
ccagtaggcg	tttttcacat	tgaagcgcac	atctactttg	gtattcactg	aataaaaaaa	240
gaaagctggg	aacatgtgaa	ggatatacaa	gcattgatac	accaagtagt	cacaaactac	300
attataaagg	tcagaccttt	gttcacattc	tggcctccag	gaccaccgct	tctagcaaag	360
ttaagcgtaa	catggtctgc	acgtatacaa	atgaaaatgt	ttctatcaaa	atcctataaa	420
atagagctct	ataacattgt	cgatacatag	tttcaactaac	tctgcaagta	ctaaacacat	480
atacaaacaa	aactatgcca	acagatcaaa	actactacag	aacacagttc	tatgacactg	540
tcgatagtaa	catcctctgc	aagtaccaa	gagatagcaa	atgaaactat	gtaaacaat	600
caaaattcta	aatttctcca	tcacaaggac	ctacagaata	gagttatcat	aacatthttct	660
gtaaataattt	ccatcaaaat	gactagagaa	cagagttcct	ataacattat	ctgtaaattgt	720
tccaacaaaa	ccactacata	gcagagttct	tataacattg	tctgtaaattg	tccaatcaaa	780
accactacag	aacaaagctc	ctataacatt	gtttatacaa	agtttcaacta	aatctacaaa	840
ctttcccctg	aatgagctt	aatatcacc	aaagatggtt	caatcagata	aagagtacga	900
catcgttttg	agattagaac	aaactgaaac	ttacgtagag	tgatttgagg	agtaggc	957

<210> 5

10 <211> 672

<212> ADN

<213> Brassica napus

<220>

<223> Marcador CP418L

15 <400> 5

aatttctcca	tcacaaggac	ctacagaata	gagttatcat	aacatthttct	gtaaataattt	60
ccatcaaaat	gactagagaa	cagagttcct	ataacattat	ctgtaaattgt	tccaacaaaa	120
ccactacata	gcagagttct	tataacattg	tctgtaaattg	tccaatcaaa	accactacag	180
aacaaagctc	ctataacatt	gtttatacaa	agtttcaacta	aatctacaaa	ctttcccctg	240
aatgagctt	aatatcacc	aaagatggtt	caatcagata	aagagtaacg	acatcgtttt	300
gagattagaa	caaactgaaa	cttacgtaga	gtgatttgag	gagtaggctc	gttgccagca	360
gagctagctc	tctcctccgc	ctcatgaagc	atctgttgca	cctgagacaa	ccgtgacgaa	420
actttccgat	caccgccacc	agaattcgac	gccgcgcac	ggaaggatcc	gaatcgggaa	480
ctgagtgaac	cagagcgatc	ccgggagtc	gacggagcga	tgggaaaaga	gagtggcacg	540
atthtcgacga	agagtggaag	aggagagggg	ggtggataaa	ctcgcgtatg	atcaagttcg	600
tcatcgctct	gattgccgcc	atthtttttg	tcagggcgct	ctgtggctta	gaagtttccc	660
atgtcaatga	ac					672

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de producción de líneas restauradoras doble cero de *Brassica napus* para la esterilidad masculina citoplásmica (emc) Ogura que presentan introgresión de rábano portadora del gen restaurador Rfo suprimido del alelo Pgi-2 de rábano y recombinado con el gen Pgi-2 de *Brassica oleracea*, y que presentan un buen valor agronómico caracterizado por la fertilidad femenina, una buena tasa de transmisión de Rfo y un vigor vegetativo elevado, incluyendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
- 10 a) cruzar las líneas emc doble cero de *Brassica napus* de primavera que comprenden una inserción suprimida de rábano en cada lado de Rfo, habiendo perdido dichas líneas emc doble cero de *Brassica napus* de primavera la expresión de isoenzima del alelo Pgi-2 del genoma del rábano y del alelo Pgi-2 del genoma de *B. oleracea*, con la línea doble cero de Drakkar de primavera para formar plantas restauradas heterocigóticas de *Brassica napus*,
- b) irradiar antes de la meiosis las plantas restauradas heterocigóticas obtenidas en la etapa a) con irradiación de rayos gamma,
- c) cruzar el polen de las flores obtenidas en la etapa b) con la línea de Wesroona de primavera emc doble cero,
- 15 d) someter a prueba la descendencia para el vigor, la fertilidad femenina y la tasa de transmisión del gen emc,
- e) seleccionar las líneas de descendencia.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la dosis de radiación en la etapa b) es de 65 Gray durante 6 min.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la prueba se realiza con la combinación de cinco marcadores seleccionados de entre PGIol, PGIint, BolJon y CP418, presentando dichos marcadores las secuencias de SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4 y SEC ID nº 5 respectivamente,
- en el que:
- el marcador PGIol presenta una banda de 248 pb,
  - el marcador pGIint presenta una banda de *Brassica* de 870 pb,

25 - el marcador BolJon presenta una banda de rábano de 630 pb, una banda de *Brassica oleracea* de 950 pb y una banda de *Brassica rapa* de 870 pb, y

  - el marcador CP418 presenta una banda de *Brassica* de 670 pb, en homocigotos de dichas líneas restauradoras.
- 30 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la prueba se realiza con la combinación de cinco marcadores seleccionados de entre PGIol, PGIUNT, PGIint, BolJon y CP418, presentando dichos marcadores las secuencias de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4 y SEC ID nº 5, respectivamente,
- en el que:
- el marcador pGIol presenta una banda de 248 pb,
  - el marcador pGIint presenta una banda de *Brassica* de 870 pb,

35 - el marcador pGIUNT presenta una banda de *Brassica* de 980 pb,

  - el marcador BolJon presenta una banda de rábano de 630 pb, una banda de *Brassica oleracea* de 950 pb y una banda de *Brassica rapa* de 870 pb, y
  - el marcador CP418 presenta una banda de 670 pb,
- en homocigotos de dichas líneas restauradoras.
- 40 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la prueba se realiza con al menos el marcador BolJon que presenta la secuencia: SEC ID nº 4 y en el que el marcador BolJon presenta una banda de rábano de 630 pb, una banda de *Brassica oleracea* de 950 pb y una banda de *Brassica rapa* de 870 pb en homocigotos de dicha línea restauradora.

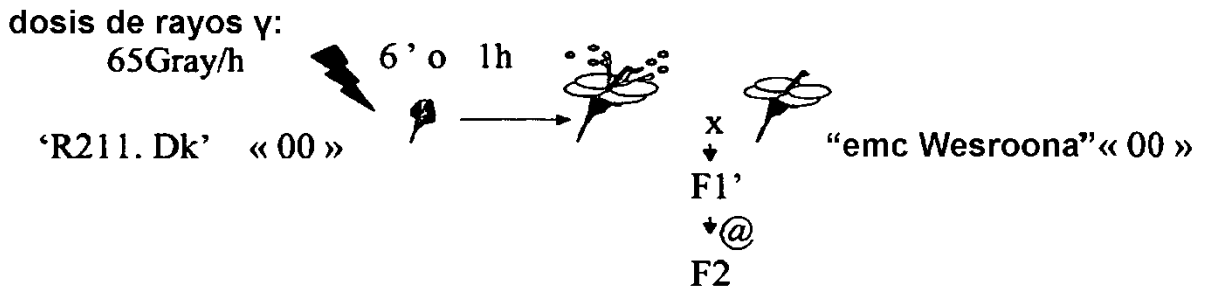


Figura 1

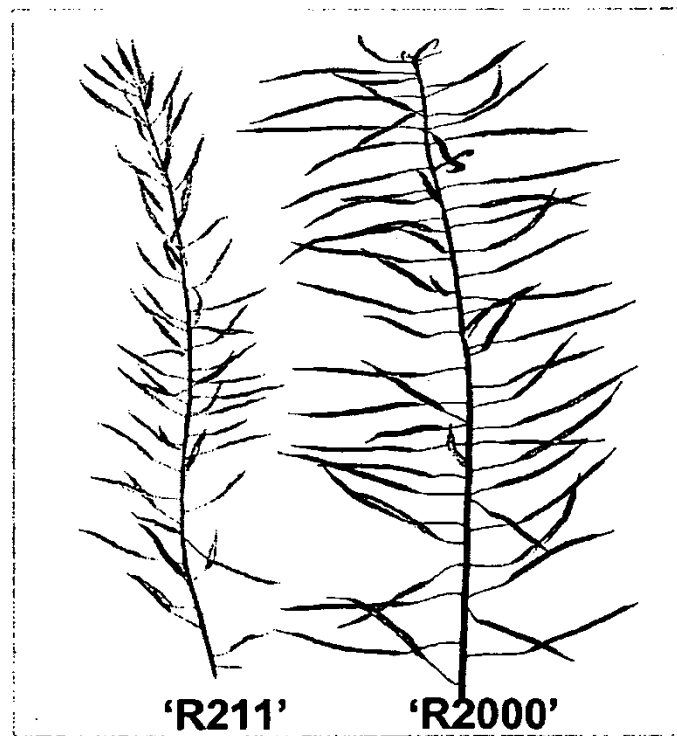


Fig. 1: Semilla colocada en 'R211' y 'R2000'

Figura 2

<b>Genotipo</b>	<b>Autopolinizaciones</b>	<b>Cruces de prueba</b>
<b>Drakkar</b>	29.3	
<b>Pactol</b>	23.1	
<b>R211</b>	11.2	25.5
<b>R2000</b>	<b>26.5 (24.0 – 31.1)</b>	<b>27.0 (24.0 – 28.7)</b>

**Figura 3**





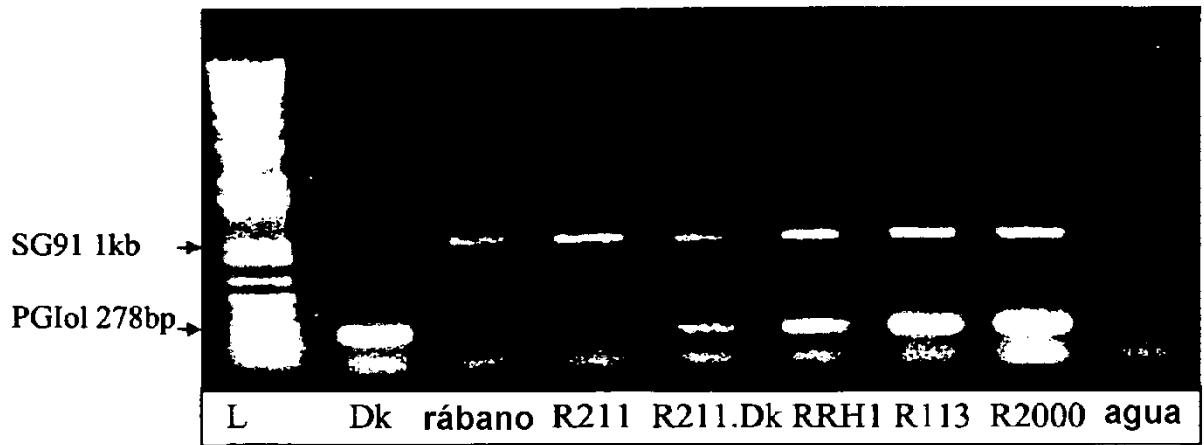
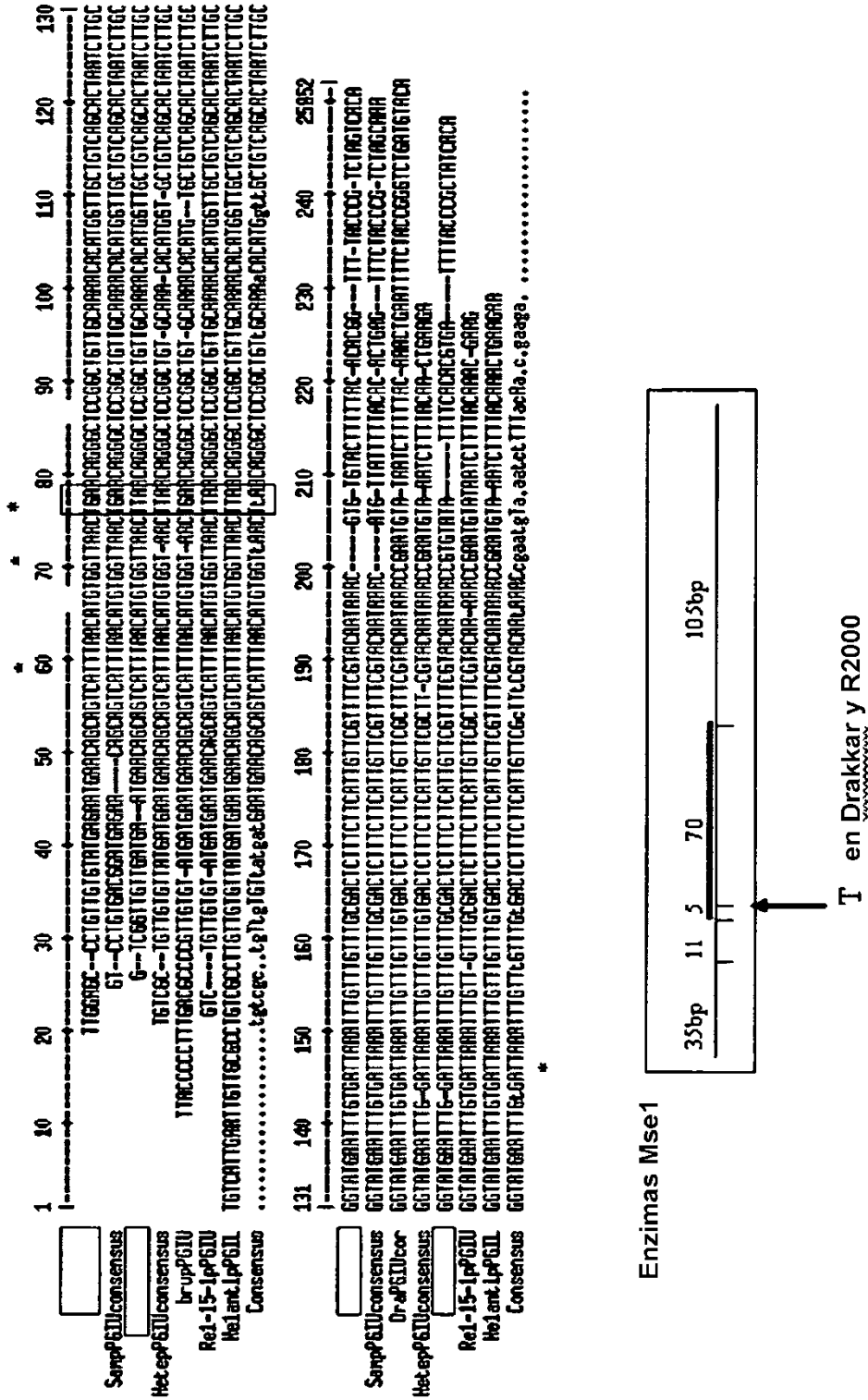


Figura 5



La enzima de restricción Mse1 corta las secuencias de ADN en los puntos T/TTA (\*)

Figura 6

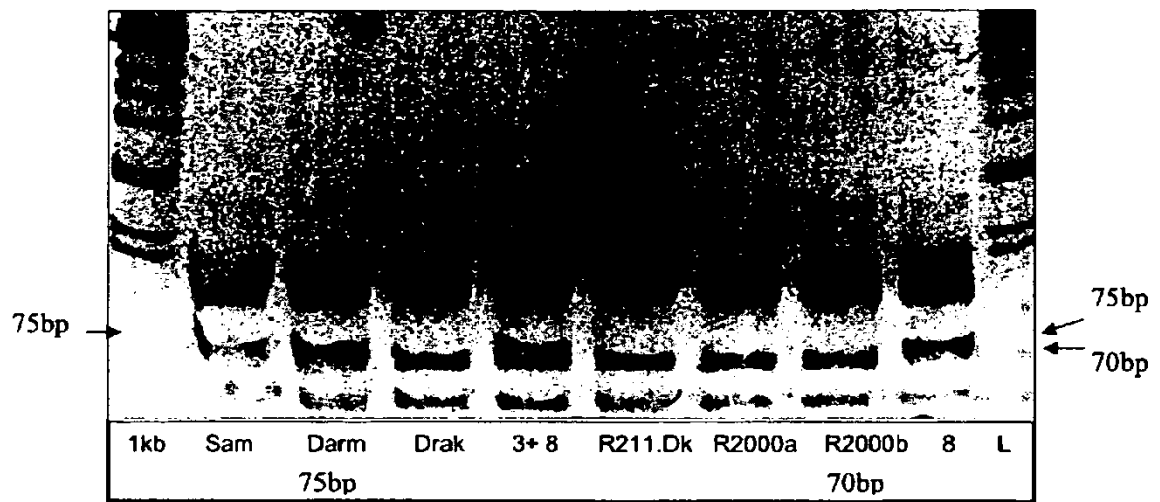


Figura 7

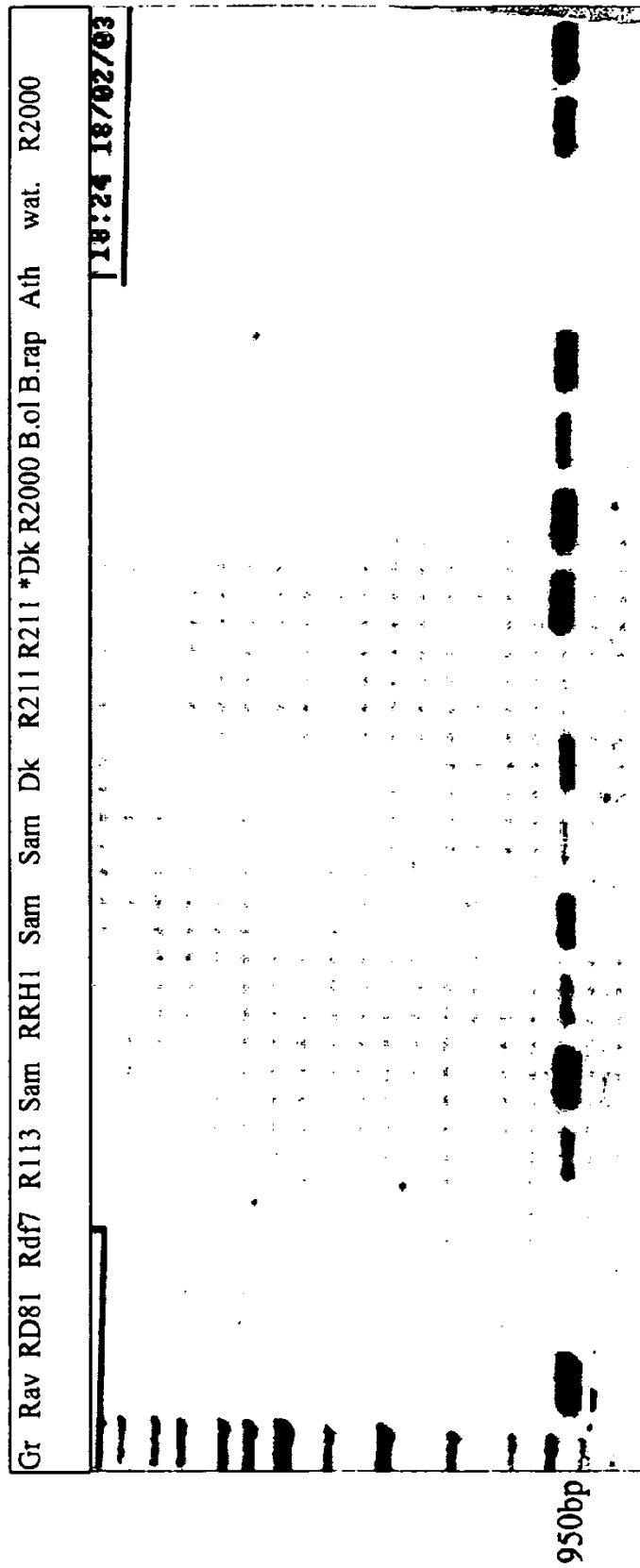


Figura 8

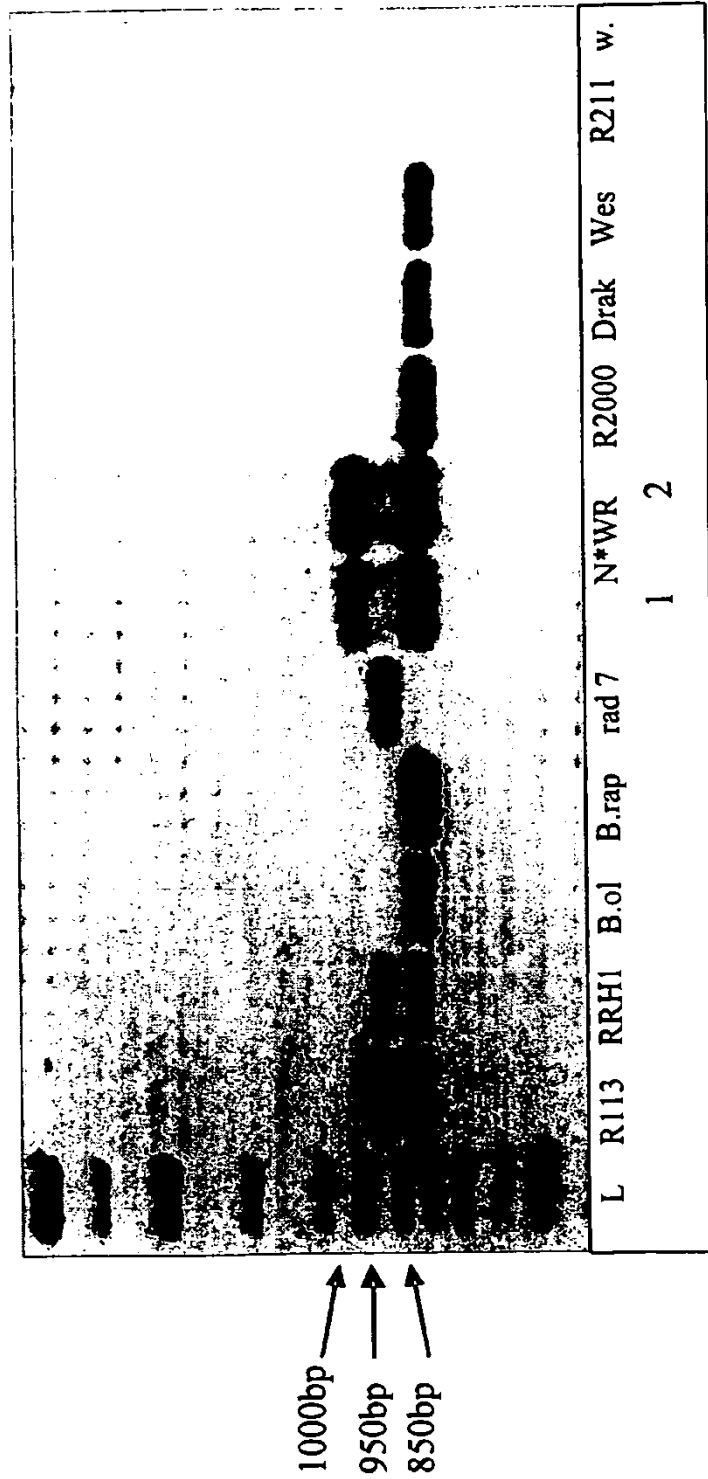


Figura 9

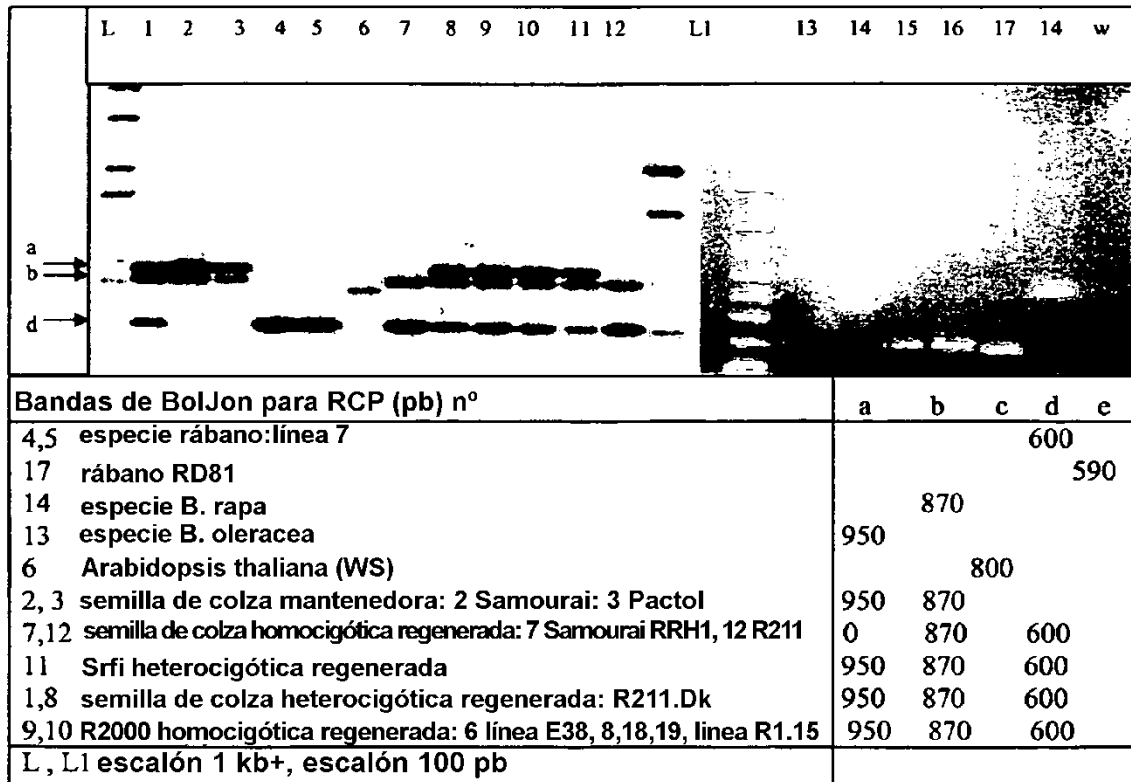
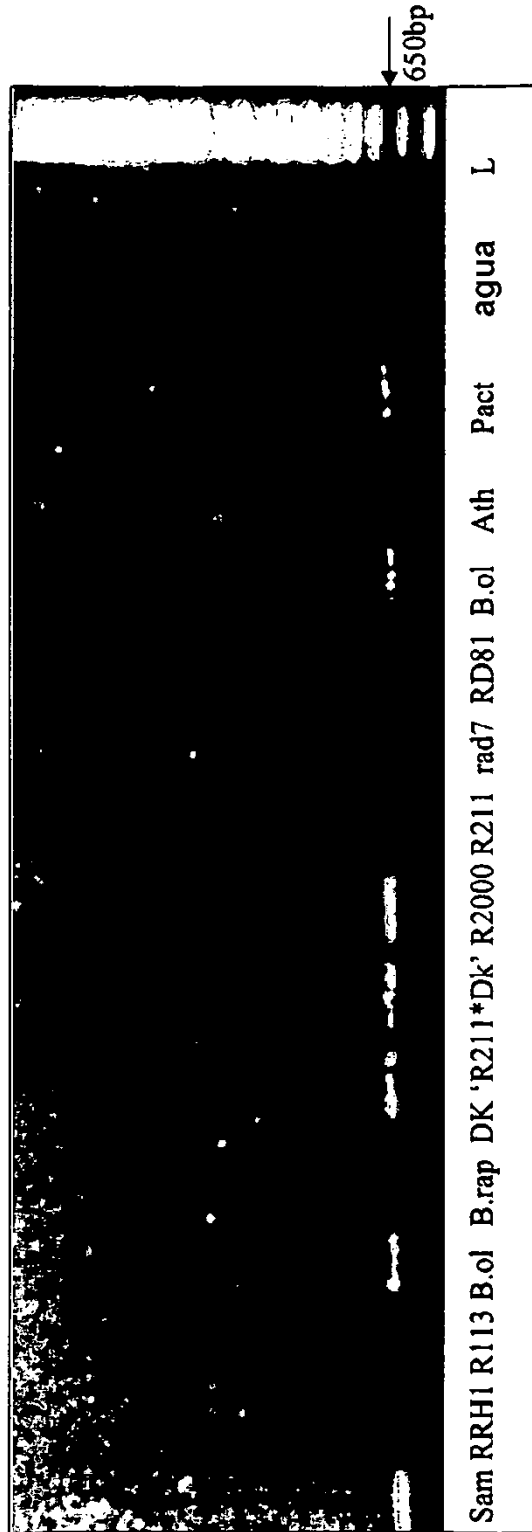


Figura 10



La banda de CP418 (aproximadamente 650 pb) específica para el genoma de *B. oleracea*. Está presente en *B. oleracea*, *B. napus* (Samourai, Drakkar, Pactol y la R211\*Dk heterocigótica) Falta en las semillas de colza regeneradas (RRH, R113 y R211) Está presente en la R2000 homocigótica.

Figura 11





```

51                                     81 PGIol U ---> 100
consePGIintUNTDrakka .....
consensWesrPGI .....
consePGIintUNTR113 .....
consePGIintUNTBrapaA .....
ConsePGIintUNTRRH1 .....
PGIBo-EM:AF258277 TTGCTTAGCG TCCAAATTC ATGATTGTAT TCATTTGATT GTTGTG....
PGIBra-EM:AF258278 TTGCTTAGCG TCCAAATTC ATGATTGTAT TCATTTGATT GTTGTGTGAC
consePGIintUNTBolera .....
consePGIintUNTR2000 ..... TTG... TCATT.GA... TTGT.TGCC
Consensus ..... 1

```

```

101 ---> 150
consePGIintUNTDrakka .....GTCG TTTGTTGGTG AGT.GAACAG CAGTCATTTA
consensWesrPGI .....GCCTGTTT TGTATGATG AAT.GAACAG CAGTCATTTA
consePGIintUNTR113 .....GCCCGTTG .....G TAT.GAAACG CAG.CATTTA
consePGIintUNTBrapaA .....G CAGTCATTTA
ConsePGIintUNTRRH1 .....CG TGTGAGAAG CAG.CATTTA
PGIBo-EM:AF258277 .....CCTG TCGCCTTGTG TGTTA.GATG AAT.GAACAG CAGTCATTTA
PGIBra-EM:AF258278 TATCGCCTC. TCGCCTTGTG TGTATGATG AAT.GAACAG CAGTCATTTA
consePGIintUNTBolera .....
consePGIintUNTR2000 .....CCTG TCGCCTTGTG TGTATGATG AAT.GAAC. CAGTCATTTA
Consensus .....t.g .....g ...t.gaa.ag cagtcattta

```

```

151 MseI restriction site 200
consePGIintUNTDrakka ACATG.TGGT TAAC1TAAACA GGGCTCCGGC TGTGCAAAA CACATGGTTG
consensWesrPGI ACATG.TGGT TAAC1TAAACA GGGCTCCGGC TGTGCAAAA CACATGGTTG
consePGIintUNTR113 ACATG.TGGT .AACTGAACA GGGCTCCGGC TGTGCCCC.. CTAAGGGTTG
consePGIintUNTBrapaA ACATGGTGGT TAAC1TGAACA GGGCTCCGGC TGTGCAAAA CACATGGTTG
ConsePGIintUNTRRH1 ACATG..GGT ..ACTGAACA GGGC.CCGGC TGTGCAA.. .ACAG...TG
PGIBo-EM:AF258277 ACATG.TGGT TAAC1TAAACA GGGCTCAGGC TGTGCAAAA CACATGGTTG
PGIBra-EM:AF258278 ACATG.TGGT TAAC1TAAACA GGGCTCCGGC TGTGCAAAA CATATGGTTG
consePGIintUNTBolera ..... C TGTGCAAAA CACATGGTTG
consePGIintUNTR2000 ACATG.TGGT TAAC1TAAACA GGGCTCCGGC TGTGCAAAA CACATGGTTG
Consensus acatg.tggt taact2.aaca gggctccggc tgttgcaaaa cacatggttg

```

```

201 PGI int U ---> 250
consePGIintUNTDrakka CTGT CAGCAC TAATCTTGC GGTATG AATT TGTGATTAAA TTTGTTTGTT
consensWesrPGI CTGT CAGCAC TAATCTTGC GGTATG AATT TGTGATTAAA TTTGTTTGTT
consePGIintUNTR113 CTGT CAGCAC TAATCTTGC GGTATG AATT TGTGATTAAA TTTGTTTGTT
consePGIintUNTBrapaA CTGT CAGCAC TAATCTTGC GGTATG AATT TGTGATTAAA TTTGTTTGTT
ConsePGIintUNTRRH1 CTGT CAGCAC TAATCTTGC GGTATG AATT TGTGATTAAA TTTGTTTGTT
PGIBo-EM:AF258277 CTGT CAGCAC TAATCTTGC GGTATG AATT TGTGATTAAA TTTGTTTGTT
PGIBra-EM:AF258278 CTGT CAGCAC TAATCTTGC GGTATG AATT TGTGATTAAA TTTGTTTGTT
consePGIintUNTBolera CTGT CAGCAC TAATCTTGC GGTATG AATT TGTGATTAAA TTTGTTTGTT
consePGIintUNTR2000 CTGT CAGCAC TAATCTTGC GGTATG AATT TGTGATTAAA TTTGTTTGTT
Consensus ctgtcagcac taatcttgc ggtatg aatt tgtgattaaa tttgtttgt

```

```

251 300
consePGIintUNTDrakka TGTGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC CGAATGTATA
consensWesrPGI TGTGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC CGAATGTATA
consePGIintUNTR113 TGGGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC ..AATGTATA
consePGIintUNTBrapaA TGGGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC ..AATGTATA
ConsePGIintUNTRRH1 TGGGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC ..AATGTATA
PGIBo-EM:AF258277 TGTGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC CGAATGTATA
PGIBra-EM:AF258278 TGTGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC CGAATGTATA
consePGIintUNTBolera TG.GACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC CGAATGTATA
consePGIintUNTR2000 TGTGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC CGAATGTATA
Consensus tg.gactctt t.cttcattg ttcgTTTTcg tacaataaac cgaatgtata

```

Figura 13 (a)

	301		<---	PGIol antL 341		350	
consePGIintUNTDrakka	ATCTTTTAC	AAACTGAA	TT	TTCTACCGGG	TCTGATGTAC	A	ATGCTAGTC
consensWesrPGI	ATCTTTTAC	AAACTGAA	TT	TTCTACCGGG	TCTGATGTAC	A	ATGCTAGTC
consePGIintUNTR113	ATCTTTTAC	AAACTGAA	TT	TTCTACCGGG	TCTGATGTAC	A	ATGCTAGTC
consePGIintUNTBrapaA	ATCTTTTAC	AAACTGAA	TT	TTCTACCGGG	TCTGATGTAC	A	ATGCTAGTC
ConsePGIintUNTRRH1	ATCTTTTAC	AAACTGAA	TT	TTCTACCGGG	TCTGATGTAC	A	ATGCTAGTC
PGIBo-EM:AF258277	ATCTTTTAC	AAACTGAA	TT	TTCTACCGGG	TCTGATGTAC	A	ATGCTAGTC
PGIBra-EM:AF258278	ACCTTTTAC	AAACTGAA	AT	GTCTACCGGG	TCTGATGTAC	A	ATGCTAGTC
consePGIintUNTBolera	ATCTTTTAC	AAACTGAA	TT	TTCTACCGGG	TCTGATGTAC	A	ATGCTAGTC
consePGIintUNTR2000	ATCTTTT.AC	AAACTGAA	TT	TTCTACCGGG	TCTGATGTAC	A	ATGCTAGTC
Consensus	atctttttac	aaactgaa	tt	ttctaccggg	tctgatgtac	a	atgctAGTC

Figura 13 (b)

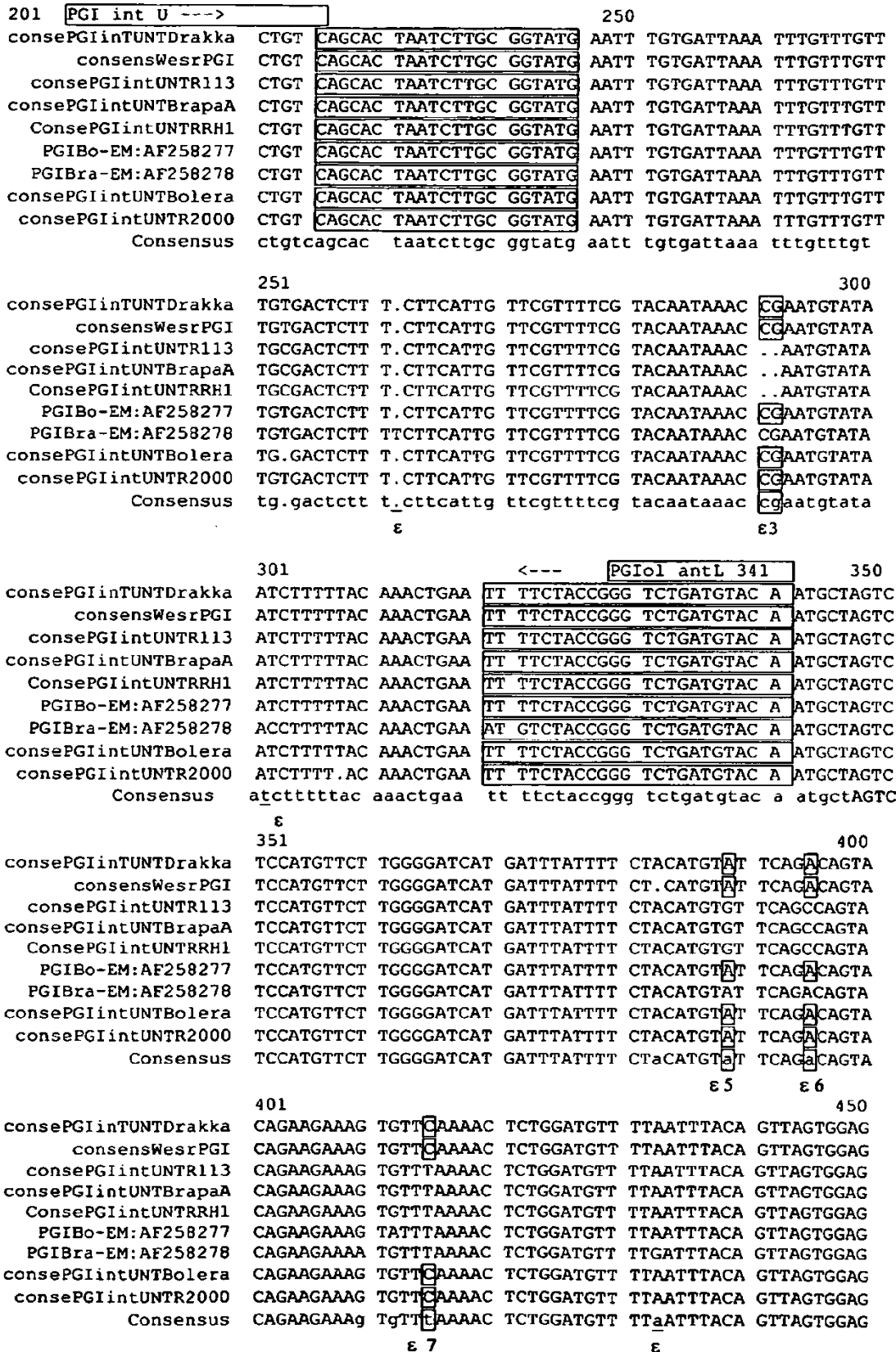


Figura 14 (a)

ES 2 394 990 T3

	451	end of Data Base PGI sequences				500
consePGIintUNTDrakka	AAGTTCGGCA	TTGATCCGAA	CAATGCATT	GCATTTGGG	ACTGGGTTGG	
consensWesrPGI	AAGTTCGGCA	TTGATCCGAA	CAATGCATT	GCATTTGGG	ACTGGGTTGG	
consePGIintUNTR113	AAGTTCGGCA	TTGATCCGAA	CAATGCATT	GCATTTGGG	ACTGGGTTGG	
consePGIintUNTBrapaA	AAGTTCGGCA	TTGATCCGAA	CAATGCATT	GCATTTGGG	ACTGGGTTGG	
ConsePGIintUNTRRH1	AAGTTCGGCA	TTGATCCGAA	CAATGCATT	GCATTTGGG	ACTGGGTTGG	
PGIBo-EM:AF258277	AAGTTCGGCA	TTGATCC...	.....	.....	.....	
PGIBra-EM:AF258278	AAGTTCGGCA	TTGATCCGAA	CAA.....	.....	.....	
consePGIintUNTBolera	AAGTTCGGCA	TTGATCCGAA	CAATGCATT	GCATTTGGG	ACTGGGTTGG	
consePGIintUNTR2000	AAGTTCGGCA	TTGATCCGAA	CAATGCATT	GCATTTGGG	ACTGGGTTGG	
Consensus	AAGTTCGGCA	TTGATCCgaa	caatgcatt	gcattttggg	actgggttgg	
	501				550	
consePGIintUNTDrakka	TGGAAGGTAC	AGTGGTAAGT	GCTTGTTTAT	TTGGTTGTAT	AAATTCTCG	
consensWesrPGI	TGGAAGGTAC	AGTGGTAAGT	GCTTGTTTAT	TTGGTTGTAT	AAATTCTCG	
consePGIintUNTR113	TGGAAGGTAC	AGTGGTAAGT	GCTTGTTTAT	TTGGTTGTAT	TAATTTCTCA	
consePGIintUNTBrapaA	TGGAAGGTAC	AGTGGTAAGT	GCTTGTTTAT	TTGGTTGTAT	TAATTTCTCA	
ConsePGIintUNTRRH1	TGGAAGGTAC	AGTGGTAAGT	GCTTGTTTAT	TTGGTTGTAT	TAATTTCTCA	
PGIBo-EM:AF258277	.....	.....	.....	.....	.....	
PGIBra-EM:AF258278	.....	.....	.....	.....	.....	
consePGIintUNTBolera	TGGAAGGTAC	AGTGGTAAGT	GCTTGTTTAT	TTGGTTGTAT	AAATTCTCG	
consePGIintUNTR2000	TGGAAGGTAC	AGTGGTAAGT	GCTTGTTTAT	TTGGTTGTAT	AAATTCTCG	
Consensus	tggaaggtac	agtggtaagt	gcttgtttat	ttggttztat	aaattctc	
					8 9	
	551				600	
consePGIintUNTDrakka	TCCATATCCG	CTTGCTTAGT	GTATAACTGA	AATTCCTTTG	CAGTTTGCAG	
consensWesrPGI	TCCATATCCG	CTTGCTTAGT	GTATAACTGA	AATTCCTTTG	CAGTTTGCAG	
consePGIintUNTR113	TCCATATCCG	CTTGCTTAGT	TTATAACTGA	AATTCCTTTG	CAGTTTGCAG	
consePGIintUNTBrapaA	TCCATATCCG	CTTGCTTAGT	TTATAACTGA	AATTCCTTTG	CAGTTTGCAG	
ConsePGIintUNTRRH1	TCCATATCCG	CTTGCTTAGT	TTATAACTGA	AATTCCTTTG	CAGTTTGCAG	
PGIBo-EM:AF258277	.....	.....	.....	.....	.....	
PGIBra-EM:AF258278	.....	.....	.....	.....	.....	
consePGIintUNTBolera	TCCATATCCG	CTTGCTTAGT	GTATAACTGA	AATTCCTTTG	CAGTTTGCAG	
consePGIintUNTR2000	TCCATATCCG	CTTGCTTAGT	GTATAACTGA	AATTCCTTTG	CAGTTTGCAG	
Consensus	tccatATccg	cttgcttagt	GTATAACTGA	AATTCCTTTG	CAGTTTGCAG	
					10 11	
	601				650	
consePGIintUNTDrakka	TGCTGTTGGA	GTCTTACCAT	TGTCTCTACA	GTATGGCTTC	TCCGTGGTTG	
consensWesrPGI	TGCTGTTGGA	GTCTTACCAT	TGTCTCTACA	GTATGGCTTC	TCCGTGGTTG	
consePGIintUNTR113	TGCTGTTGGA	GTCTTACCAT	TGTCTCTACA	GTATGGCTTC	TCCGTGGTTG	
consePGIintUNTBrapaA	TGCTGTTGGA	GTCTTACCAT	TGTCTCTACA	GTATGGCTTC	TCCGTGGTTG	
ConsePGIintUNTRRH1	TGCTGTTGGA	GTCTTACCAT	TGTCTCTACA	GTATGGCTTC	TCCGTGGTTG	
PGIBo-EM:AF258277	.....	.....	.....	.....	.....	
PGIBra-EM:AF258278	.....	.....	.....	.....	.....	
consePGIintUNTBolera	TGCTGTTGGA	GTCTTACCAT	TGTCTCTACA	GTATGGCTTC	TCCGTGGTTG	
consePGIintUNTR2000	TGCTGTTGGA	GTCTTACCAT	TGTCTCTACA	GTATGGCTTC	TCCGTGGTTG	
Consensus	tgctgttgga	gtcttaccat	tgtctctaca	gtatggcttc	tccgtggttg	
					12	
	651				700	
consePGIintUNTDrakka	AGAAGTACGG	TACCTTCTAC	TTTATTAGCC	ATCTCATAAA	ATGCTTTAGG	
consensWesrPGI	AGAAGTACGG	TACCTTCTAC	TTTATTAGCC	ATCTCATAAA	ATGCTTTAGG	
consePGIintUNTR113	AGAAGTACGG	TACCTTCTAC	TTTATTAGCC	ATCTCATAAA	ATGCTTTGGG	
consePGIintUNTBrapaA	AGAAGTACGG	TACCTTCTAC	TTTATTAGCC	ATCTCATAAA	ATGCTTTGGG	
ConsePGIintUNTRRH1	AGAAGTACGG	TACCTTCTAC	TTTATTAGCC	ATCTCATAAA	ATGCTTTGGG	
PGIBo-EM:AF258277	.....	.....	.....	.....	.....	
PGIBra-EM:AF258278	.....	.....	.....	.....	.....	
consePGIintUNTBolera	AGAAGTACGG	TACCTTCTAC	TTTATTAGCC	ATCTCATAAA	A.GCTTTAGG	
consePGIintUNTR2000	AGAAGTACGG	TACCTTCTAC	TTTATTAGCC	ATCTCATAAA	ATGCTTTAGG	
Consensus	agaagtacgg	taccttctac	tttatTAGCC	atctcataaa	atgctttggg	
					13 14	

Figura 14 (b)

	701				750
consePGIintUNTDrakka	CATATTCTTT	CTATTTTATT	TTCCTCTTAA	TGATTTCTTC	TTTTTTTTAT
consensWesrPGI	CATATTCTTT	CTATTTTATT	TTCCTCTTAA	TGATTTCTTC	TTTTTTTTAT
consePGIintUNTR113	CATATTCTTT	CTATTTTATT	TTCCTCTGAA	TGATTTCTTC	TCTTTTAT..
consePGIintUNTBrapaA	CATATTCTTT	CTATTTTATT	TTCCTCTGAA	TGATTTCTTC	TCTTTTAT..
ConsePGIintUNTRRH1	CATATTCTTT	CTATTTTATT	TTCCTCTGAA	TGATTTCTTC	TCTTTTAT..
PGIBo-EM:AF258277	.....	.....	.....	.....	.....
PGIBra-EM:AF258278	.....	.....	.....	.....	.....
consePGIintUNTBolera	CATATTCTTT	CTATTTTATT	TTCCTCTTAA	TGATTTCTTC	TTTTTTTTA..
consePGIintUNTR2000	CATATTCTTT	CTATTTTATT	TCCCTCTTAA	TGATTTCTTC	TTTTTTTTAT
Consensus	catattcttt	ctattttatt	ttcctctjaa	tgatttcttc	t.tttt.t..
			15		16 17
	751				800
consePGIintUNTDrakka	TGCATTCCCG	TTTTATTTTC	AAAAGTTGTT	ACTGTCTCTA	AATCAAGAAG
consensWesrPGI	TGCATTCCCG	TTTTATTTTC	AAAAGTTGTT	ACTGTCTCTA	AATCAAGAAG
consePGIintUNTR113	TGCATTCCCG	TTTTATTTTC	AAAAGTTGTC	ACTGTCTCTA	AATCAAGAAG
consePGIintUNTBrapaA	TGCATTCCCG	TTTTATTTTC	AAAAGTTGTC	ACTGTCTCTA	AATCAAGAAG
ConsePGIintUNTRRH1	TGCATTCCCG	TTTTATTTTC	AAAAGTTGTC	ACTGTCTCTA	AATCAAGAAG
PGIBo-EM:AF258277	.....	.....	.....	.....	.....
PGIBra-EM:AF258278	.....	.....	.....	.....	.....
consePGIintUNTBolera	TGCATTCCCG	TTTTATTT.C	AAAAGTTGTC	CGGCCCCCTA	AACCAAGAAG
consePGIintUNTR2000	TGCATTCCCG	TTTTATTTTC	AAAAGTTGTT	ACTGTCTCTA	AATCAAGAAG
Consensus	tgcatccccg	ttttattttc	aaaagttgt.	actgtctcta	aatcaagaag
	801				850
consePGIintUNTDrakka	AAACCTTCTT	AGTAGATCCA	GCTGATATTC	AGCCTTTTCT	AAATTGGACT
consensWesrPGI	AAACCTTCTT	AGTAGATCCA	GCTGATATTC	AGCCTTTTCT	AAATTGGACT
consePGIintUNTR113	AAACCTTCTT	AGTAGATCCA	GTTGATATTC	AGCCTTTTCT	AAATTGGACT
consePGIintUNTBrapaA	AAACCTTCTT	AGTAGATCCA	G.TGATATTC	AGCCTTTTCT	AAATTGGACT
ConsePGIintUNTRRH1	AAACCTTCTT	AGTAGATCCA	GTTGATATTC	AGCCTTTTCT	AAATTGGACT
PGIBo-EM:AF258277	.....	.....	.....	.....	.....
PGIBra-EM:AF258278	.....	.....	.....	.....	.....
consePGIintUNTBolera	AAACCTTCTT	AGGA...CCA	GA...CTCC	ACCCTTTTCT	AAATTGGACT
consePGIintUNTR2000	AAACCTTCTT	AGTAGATCCA	GCTGATATTC	AGCCTTTTCT	AAATTGGACT
Consensus	aaaccttctt	agtagatcca	g.tgatattc	agccttttct	aaattggact
			18		19
	851				900
consePGIintUNTDrakka	GCAGGTTTTT	AAA.GGGAGC	TTCAAGCATT	GATCAGCATT	TCCAGTCCCC
consensWesrPGI	GCAGGTTTTT	AAA.GGGAGC	TTCAAGCATT	GATCAGCATT	TCCAGTCCAC
consePGIintUNTR113	GCAGGTTTTT	AAA.GGGAGC	TTCAAGCATT	GATCAGCATT	TCCAGTCC..
consePGIintUNTBrapaA	GCAGGTTTTT	AAA.GGGAGC	TTCAAGCATT	GATCAGCATT	TCCAGTCC..
ConsePGIintUNTRRH1	GCAGGTTTTT	AAA.GGGAGC	TTCAAGCATT	GATCAGCATT	TCCAGTCCAC
PGIBo-EM:AF258277	.....	.....	.....	.....	.....
PGIBra-EM:AF258278	.....	.....	.....	.....	.....
consePGIintUNTBolera	GCAGGTTTTT	AAA.GGGGGC	TTCAAGCATT	GATCAGCATT	TCCAGTCCAC
consePGIintUNTR2000	GCAGGTTTTT	AAACGGGAGC	TTCAAGCATT	GATCAGCATT	TCCAGTCCAC
Consensus	gcaggttttt	aaa.gggagc	ttcaagcatt	gatcagcatt	tccagtcc.c
					20
	901				950
consePGIintUNTDrakka	ACC.GTTTGA	GAAGAATATA	CCCGTGAGTT	GCATTAGTTT	GTGTGATTAT
consensWesrPGI	ACC.GTTTGA	GAAGAATATA	CCCGTGAGTT	GCATTAGTT.	GTGTGATTAT
consePGIintUNTR113	.CCCGTTTGA	GAAGAATATA	CCCGTGAGTT	GCATTAGTT.	.GTGATTAT
consePGIintUNTBrapaA	.CCCGTTTGA	GAAGAATATA	CCCGTGAGTT	GCATTAGTT.	GTGTGATTAT
ConsePGIintUNTRRH1	ACC.GTTTGA	GAAGAATATA	CCCGTGAGTT	GCATTAGTT.	GTGTGATTAT
PGIBo-EM:AF258277	.....	.....	.....	.....	.....
PGIBra-EM:AF258278	.....	.....	.....	.....	.....
consePGIintUNTBolera	ACCGTTTGA	GAAGAATATA	CCCGTGAGTT	GCATTAGTT.	GTGTGATTAT
consePGIintUNTR2000	ACC.GTTTGA	GAAGAATATA	CCCGTGAGTT	GCATTAGTT.	GTGTGATTAT
Consensus	acc.gtttga	gaagaatata	cccgtagtt	gcattagtt.	gtgtgattat

Figura 14 (c)

```

951
consePGIintUNTDrakka ACAGTTTTTC TTGTCTTTTT GCTATGCCCA TCAACACTAG AAGATTCGTG 1000
consensWesrPGI ACAGTTTT.C TTGTCTTTT. GCTATGTCCA TCAACACTAG A.GATTCGTG
consePGIintUNTR113 ACAGTTTT.C TTGCCTTTTT GCTAT..AGG GCAAC.CTAG A.GATTCATG
consePGIintUNTRapaa ACAGTTTT.C TTGTCTTTT. GCTATG.TCA TCAAC.CTAG A.GATTCATG
ConsePGIintUNTRRH1 ACAGTTTT.C TTGTCTTTTT GCTAT...AT GCAACCCTAG ..GATTCATG
PGIBo-EM:AF258277 .....
PGIBra-EM:AF258278 .....
consePGIintUNTBolera ACAGTTTT.C TTGTCTTTTT GCTAG..TGA TCAAC.CTAG A.GATTCGTG
consePGIintUNTR2000 ACAGTTTT.C TTGTCTTTTT GCTATGTCCA TCAACACTAG A.GATTCGTG
Consensus acagtttt.c ttgtcttttt gctat....a tcaac.ctag a.gattcgtg
21

1001
consePGIintUNTDrakka AAGTTATTAG TGTAGCCAAC GCCTAGGGGG AGGTTGGTTG GCTGTTTTGG 1050
consensWesrPGI AAGTTATTAG TGTAGTCAAC GCA.....
consePGIintUNTR113 AAGTTATTAG TGTAGTCAAC GCAGAGGAGA G..TTCCTG ACGG.....
consePGIintUNTRapaa AAGTTATTAG TGTAGTCAAC GCAGAGTGAG AGG.TGATTG .....
ConsePGIintUNTRRH1 AAGTTATTAG TGTAGTCAAC GCAGAGGAGG AGATGGTT..
PGIBo-EM:AF258277 .....
PGIBra-EM:AF258278 .....
consePGIintUNTBolera AAGTTATTAG TGTAGTCAAC GCATAGGAGG AGC.....
consePGIintUNTR2000 AAGTTATTAG TGTAGTCAAC GCATAGGGAG AGGTGAT.GG TGACTTTTTGG
Consensus aagttattag tgtagtcaac gca.agg.g. .g.....

1051
consePGIintUNTDrakka ACGTTTTTAC GTGCTCCGGG 1076 GGTTTTTTGG GGACCAAACC CCCAAC
consensWesrPGI .....
consePGIintUNTR113 .....
consePGIintUNTRapaa .....
ConsePGIintUNTRRH1 .....
PGIBo-EM:AF258277 .....
PGIBra-EM:AF258278 .....
consePGIintUNTBolera .....
consePGIintUNTR2000 ACGATTTCAG GTGCTTTAGG GTTATTG.....

```

Figura 14 (d)

	51		100
EMB44836anti	.....	.....	.....
GCP18-5CP418L-Sams	.....	.....	.....
GCP18-2CP418L-Wes	.....	.....	.....
GCP18-4CP418L-R2000	.....	.....	.....
consel29ba1-Drak	.....	AAACAAATCA	AAATTCTAA TTTCCTCCA
GCPS18-129Sam-ba2	.....	AAAC TATGTA	ACAAAAATCA AAATTGTAAT TGTCTCCA
GCPR18-3129R211-ba2	.....	.....	AA CCAAAAATCC AAATTGTAAT TGTTCCTC.
GCP18-10129R20-ba2	.....	.....	CAAAAATCCA AAATTGTAAT TGTTC.CCT
Consensus	.....	.....	.....
	101		150
EMB44836anti	.....	.....	.....
GCP18-5CP418L-Sams	.....	.....	.....
GCP18-2CP418L-Wes	.....	.....	.....
GCP18-4CP418L-R2000	.....	.....	.....
consel29ba1-Drak	TCACAAGGAC	GTACAGAATA	GAGTTATCAT AACATTT CT GTAA
GCPS18-129Sam-ba2	TGGTAAAGGAC	GTACAGAATA	GAGTTATCAT AACATTTTCT G AA
GCPR18-3129R211-ba2	TGGTAAAGGAC	CTCAAAAA.A	GAGGTATCAA AAC.TTTTCT GT.A
GCP18-10129R20-ba2	TGGTAAAGGAC	C.CAAAA.A	AAGGT..CAA AACTT.TCCG GTAA
Consensus	.....	.....	.....
	151		200
EMB44836anti	.....	.....	.....
GCP18-5CP418L-Sams	.TATTCCAT	CAAAATGA..	.CTAGAGAAC AGCAGTTCTT ATAACATTAT
GCP18-2CP418L-Wes	.TATTCCAT	CAAAATGA..	.CTAGAGAAC AG.AGTTCTT ATAACATTAT
GCP18-4CP418L-R2000	ATATTCCAT	CAAAATGA..	.CTAGAGAAC AG.AGTTCTT ATAACATTAT
consel29ba1-Drak	ATATTCCAT	CAAAATGA..	.CTAGAGAAC AG.AGTTCTT ATAACATTAT
GCPS18-129Sam-ba2	ATGTTCCAT	CAAAATGA	CTATCGAAC ATAATTAAT ATA.CATTT
GCPR18-3129R211-ba2	ATGTTCCAT	CAAAATG.	CTATCGGAC ATAATTAAT ATAAC.TTCT
GCP18-10129R20-ba2	ATGTTCCAT	CAAAATG.	CTTCGGA.C ATAATTAAT ATAAC.TTCT
Consensus	ATGTTCCCT	CAAA.TGG	CTTCGGA.C ATAATTAAT A...CATTCT
	201		250
EMB44836anti	.....	.....	.....
GCP18-5CP418L-Sams	CTGTAAA TG.TTCCAA	CAAAA CCACT	ACATAGCAGAGTTC .TTATAACAT
GCP18-2CP418L-Wes	CTGTAAA TG.TTCCAA	CAAAA CCACT	ACATAGCAGAGTTC ATTATAACAT
GCP18-4CP418L-R2000	CTGTAAA TG.TTCCAA	CAAAA CCACT	ACATAGCAGAGTTC .TTATAACAT
consel29ba1-Drak	CTGTAAA TG.TTCCAA	CAAAA CCACT	ACATAGCAGAGTTC .TTATAACAT
GCPS18-129Sam-ba2	CTG[AAAATAA]TTCCCT	CAAAA[TTA].	.CAIT[ ]TTC TTACAA[A].
GCPR18-3129R211-ba2	CTG[AAAAT]TTCCCT	CAAAA[TTA].	ACAIT[ ]TTC T.ACAA[A].
GCP18-10129R20-ba2	CTG[AAA.T]TTCCCT	CAAAA[TTA].	ACAIT[ ]TTC T.ACAA[A].
Consensus	.....	.....	.....
	251		300
EMB44836anti	.....	.....	.....
GCP18-5CP418L-Sams	TGTCGT.AA	ATGTCCAATC	AAAACCACTA CAGAACAAG CTCCTATAAC
GCP18-2CP418L-Wes	TGTCGT.AA	ATGTCCAATC	AAAACCACTA CAGAACAAG CTCCTATAAC
GCP18-4CP418L-R2000	TGTCGT.AA	ATGTCCAATC	AAAACCACTA CAGAACAAG CTCCTATAAC
consel29ba1-Drak	TGTCGT.AA	ATGTCCAATC	AAAACCACTA CAGAACAAG CTCCTATAAC
GCPS18-129Sam-ba2	TGT[TTTC].....	.....	CATCAAAAATG AGACTACA.G
GCPR18-3129R211-ba2	TGT[TTTC].....	.....	CATCAAAAATG AGACTACA.G
GCP18-10129R20-ba2	TGT[TTTC].....	.....	CATCAAAAATG AGACTACA.G
Consensus	tttctgt.aa	tgtttccatc	aaaatgacta tcaacataa ttaatataac
	301		350
EMB44836anti	A	TTGTTT	ATACAAAGTT TCACT AAAT CTACAACTT CCCCCGTAAA
GCP18-5CP418L-Sams	A	TTGTTT	ATACAAAGTT .CACT AAAT CTACAACTT TCCCCGTAAA
GCP18-2CP418L-Wes	A	TTGTTT	ATACAAAGTT TCACT AAAT CTACAACTT TCCCCGTAAA
GCP18-4CP418L-R2000	A	TTGTTT	ATACAAAGTT .CACT AAAT CTACAACTT TCCCCGTAAA
consel29ba1-Drak	A.	TGTTT	ATACAAAGTT TCACT AAAT CTACAACTT TCCCCGTAAA
GCPS18-129Sam-ba2	AAC.CAGTTC	TTGCAATAGTT	TCACTTAAAT CTACAACTT TC.....
GCPR18-3129R211-ba2	AACACAGTTC	TTGCAATAGTT	TCACT.AAAT CTACAACTT TC.....
GCP18-10129R20-ba2	A.CCCAGTTC	TTGCAATAGTT	TC.CT.AAAT CTTCAACTT TC.....
Consensus	.....	.....	.....

Figura 15 (a)

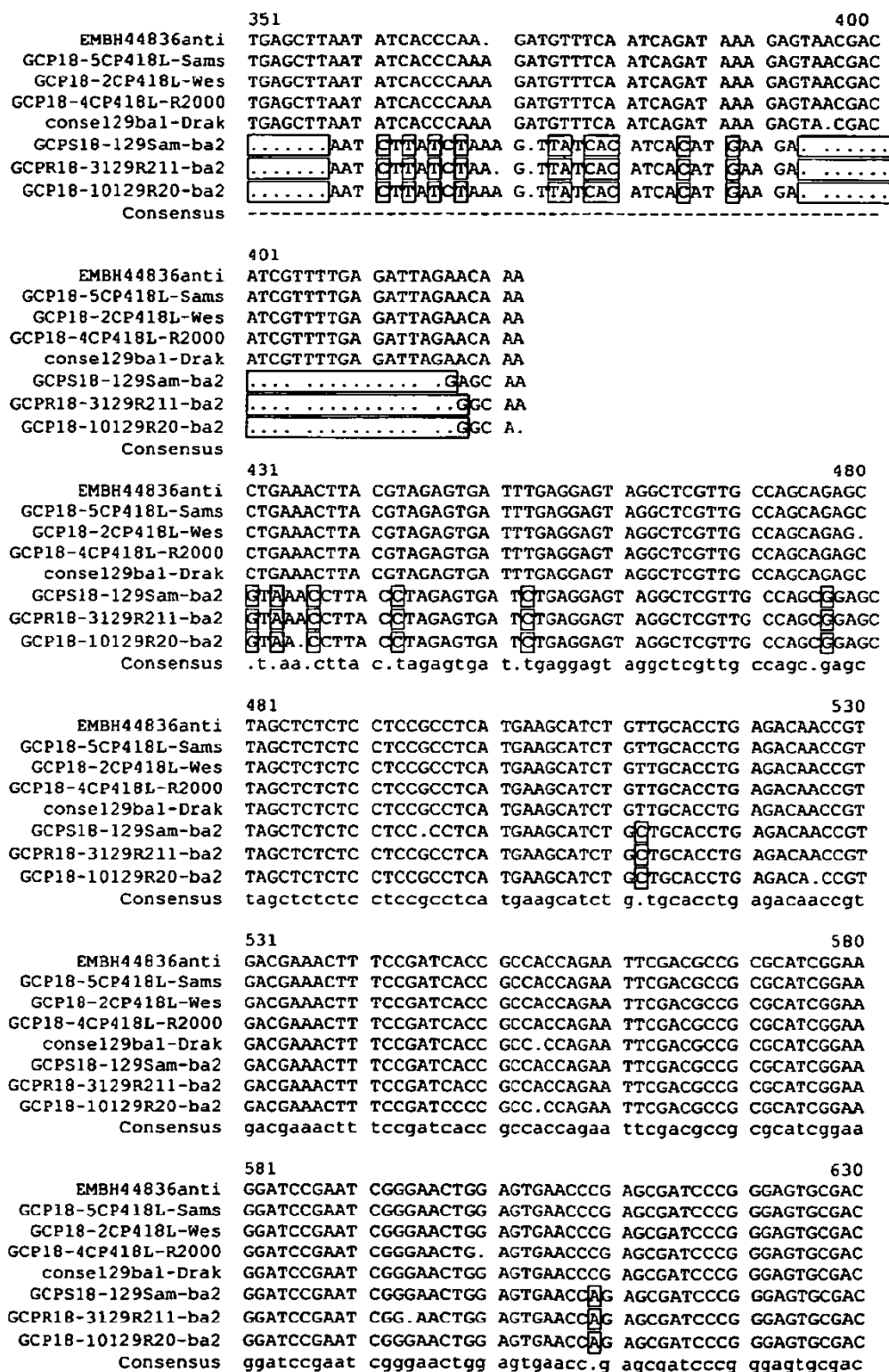


Figura 15 (b)



	631			690
EMBH44836anti	GGAGCGATGG	GAAAAGAGAG	TGGCACGATT	TCGACGAAGA GTGGAAGAGG
GCP18-5CP418L-Sams	GGAGCGATGG	GAAAAGAGAG	TGGCACGATT	TCGACGAAGA GTGGAAGAGG
GCP18-2CP418L-Wes	GGAGCGATGG	GAAAAGAGAG	TGGCACGATT	TCGACGAAGA GTGGAAGAGG
GCP18-4CP418L-R2000	GGAGCGATGG	GAAAAGAGAG	TGGCACGATT	TCGACGAAGA GTGGAAGAGG
conse129ba1-Drak	GGAGCGATGG	GAAAAGAGAG	TGGCACGATT	TCGACGAA.A GTGGAAGAGG
GCPS18-129Sam-ba2	GGAGCGATGG	A AAAAGAGAG	TGGCACGATT	TCGACGAAGA GAGGAAGAGG
GCPR18-3129R211-ba2	GGAGCGATGG	A AAAAGAGAG	TGGCACGATT	TCGACGAAGA GAGGAAGAGG
GCP18-10129R20-ba2	GGAGCGATGG	A AAAAGAGAG	TGGCACGATT	TCG.CGAAGA GAGGAAGAGG
Consensus	ggagcg.tgg	.aaaagagag	tggcacgatt	tcgacgaaga g.ggaagagg
	691			740
EMBH44836anti	AGAGGGTGGT	GGATAAACTC	GCGTATGATC	AAGTTCGTCA TCGTCCTGAT
GCP18-5CP418L-Sams	AGAGGGTGGT	GGATAAACTC	GCGTATGATC	AAGTTCGTCA TCGTCCTGAT
GCP18-2CP418L-Wes	AGAGGGTGGT	GGATAAACTC	GCGTATGATC	AAGTTCGTCA TCGTCCTGAT
GCP18-4CP418L-R2000	AGAGGGTGGT	GGATAAACTC	GCGTATGATC	AAGTTCGTCA TCGTCCTGAT
conse129ba1-Drak	AGAGGGTGGT	GGATAAACTC	GCGTATGATC	AAGTTCGTCA TCGTCCTGAT
GCPS18-129Sam-ba2	AGAGGGTGGT	GGATAAACTC	GCGTATGATC	AAGTTCGTCA TCGTCCTGAT
GCPR18-3129R211-ba2	AGAGG.TGGT	GGATAAACTC	GCGTATGATC	AAGTTCGTCA TCGTCCTGAA
GCP18-10129R20-ba2	AGAGGGTGGT	GGATAAACTC	GCGTATGATC	AAGTTCGTCA TCGTCCTGAA
Consensus	agaggggtggt	ggataaaactc	gcgtatgatc	aagttcgtca tcgtcctga.
	741			psG129antiU 790
EMBH44836anti	TGCCGCCATT	TTTTTTGTCA	GGGCGCTCTG	TGGCTTAGAA GTTTCCGATG
GCP18-5CP418L-Sams	TGCCGCCATT	TTTTTTGTCA	GGGCGCTCTG	TGGCTTAGAA GTTTCCGATG
GCP18-2CP418L-Wes	TGCCGCCATT	TTTTTTGTCA	GGGCGCTCTG	TGGCTTAGAA GTTTCCGATG
GCP18-4CP418L-R2000	TGCCGCCATT	TTTTTTGTCA	GGGCGCTCTG	TGGCTTAGAA GTTTCCGATG.
conse129ba1-Drak	TGCCGCCATT	TTTTTTGTCA	GGGCGCTCTG	.GGCTTAGAA GTTTCCGA..
GCPS18-129Sam-ba2	TGCCGCCATT	CTTGTTTAC.	.GGGCGCTCTG	GGT.....
GCPR18-3129R211-ba2	TGCCGCC...	.....	.....	.....
GCP18-10129R20-ba2	TGCC..CAT.	CTTGAGCTC.	.GG.GCGCGG	GCTCACAA..
Consensus	tgccgccat.	.tt.....c.	.gg.gc.c.g	.....
	791			
EMBH44836anti	<u>TCAATGAAC</u>	A	GTGACACGAC	GAAATGC
GCP18-5CP418L-Sams	TCAATGAAC	AGAAT...TC	CGGG...	
GCP18-2CP418L-Wes	CCAATGAACA	AGATTATTC	CGATG..	
GCP18-4CP418L-R2000	.....	.....	.....	
conse129ba1-Drak	.....	.....	.....	

Figura 15 (c)



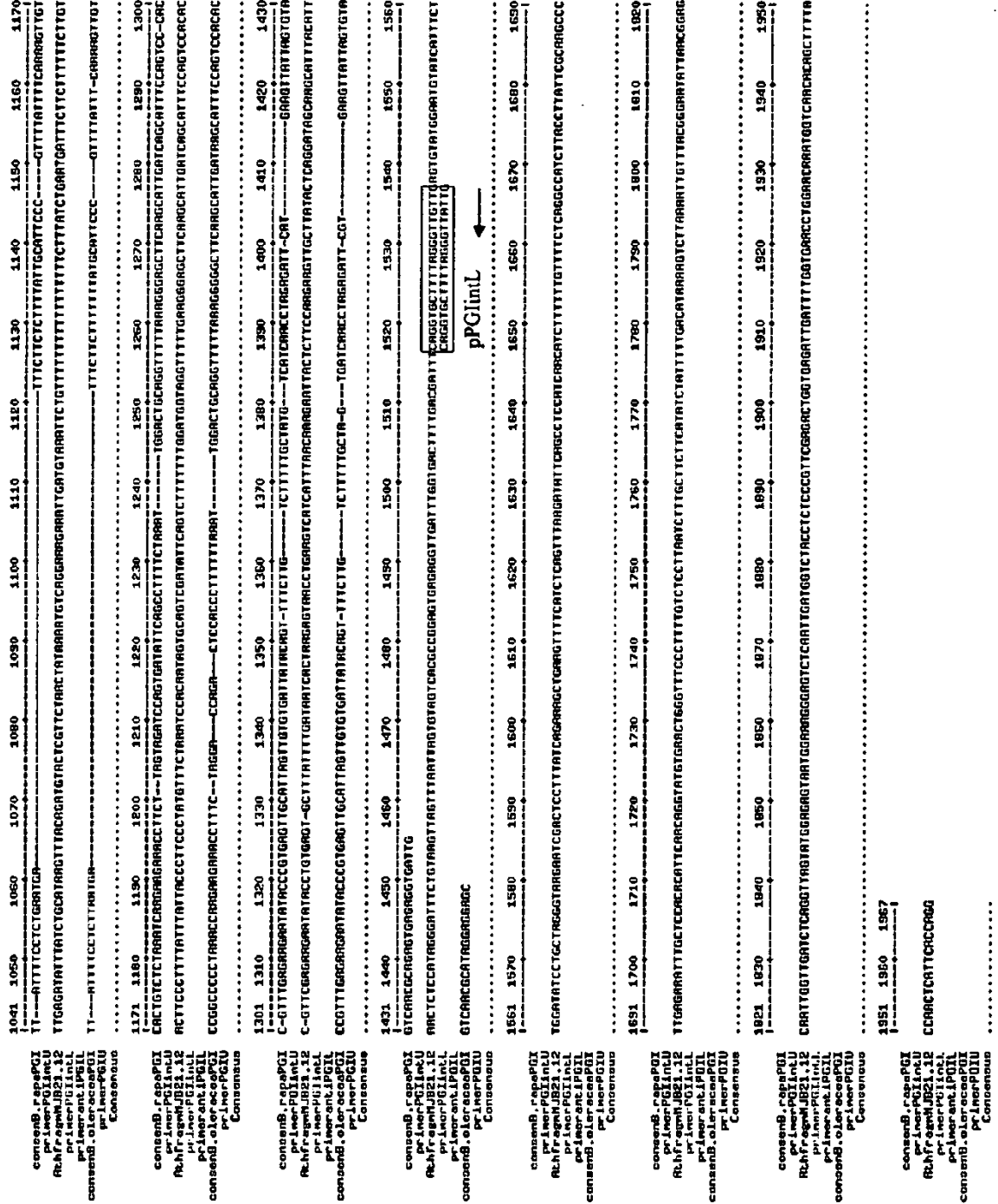


Figura 16 bis

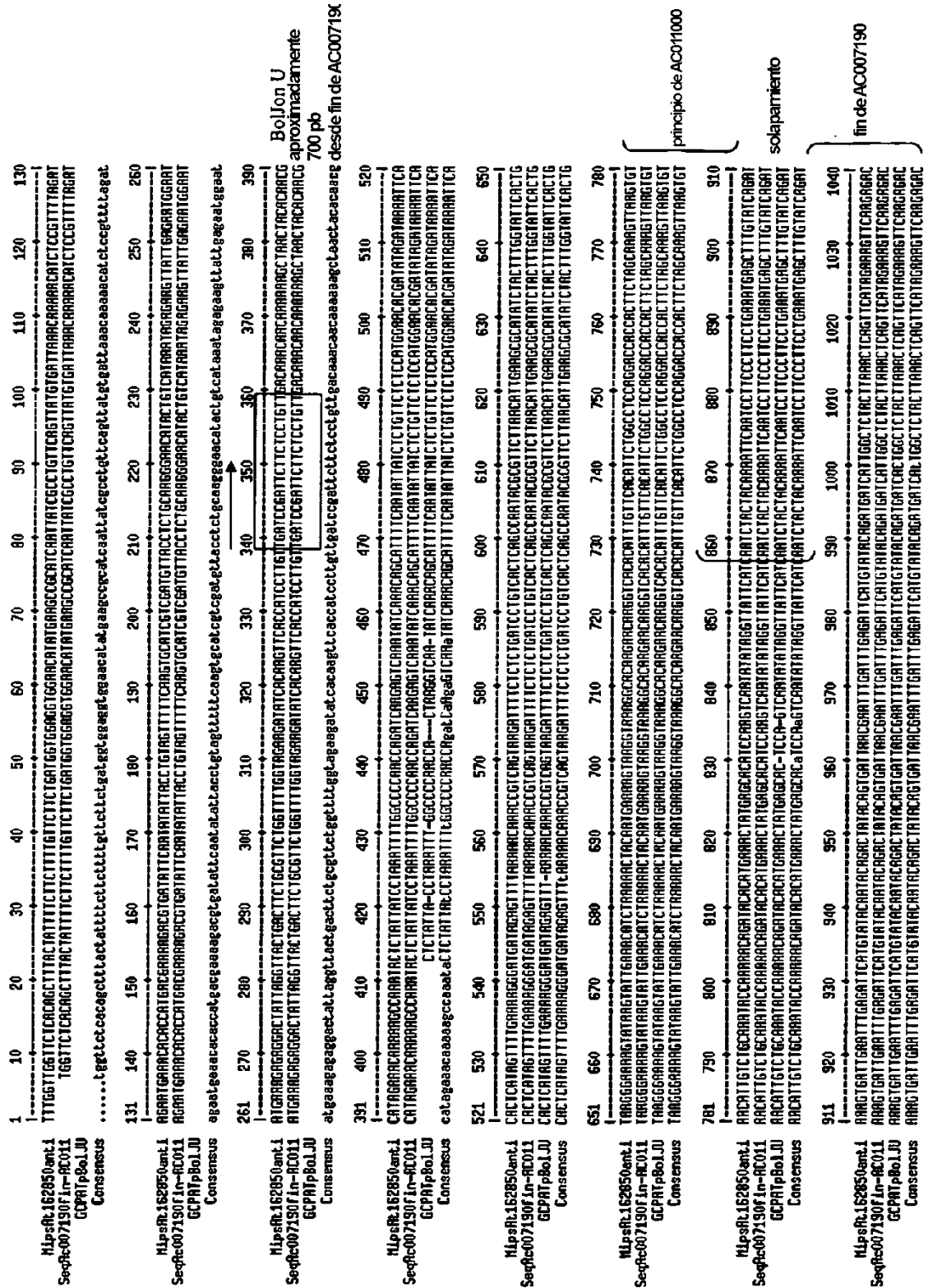


Figura 17

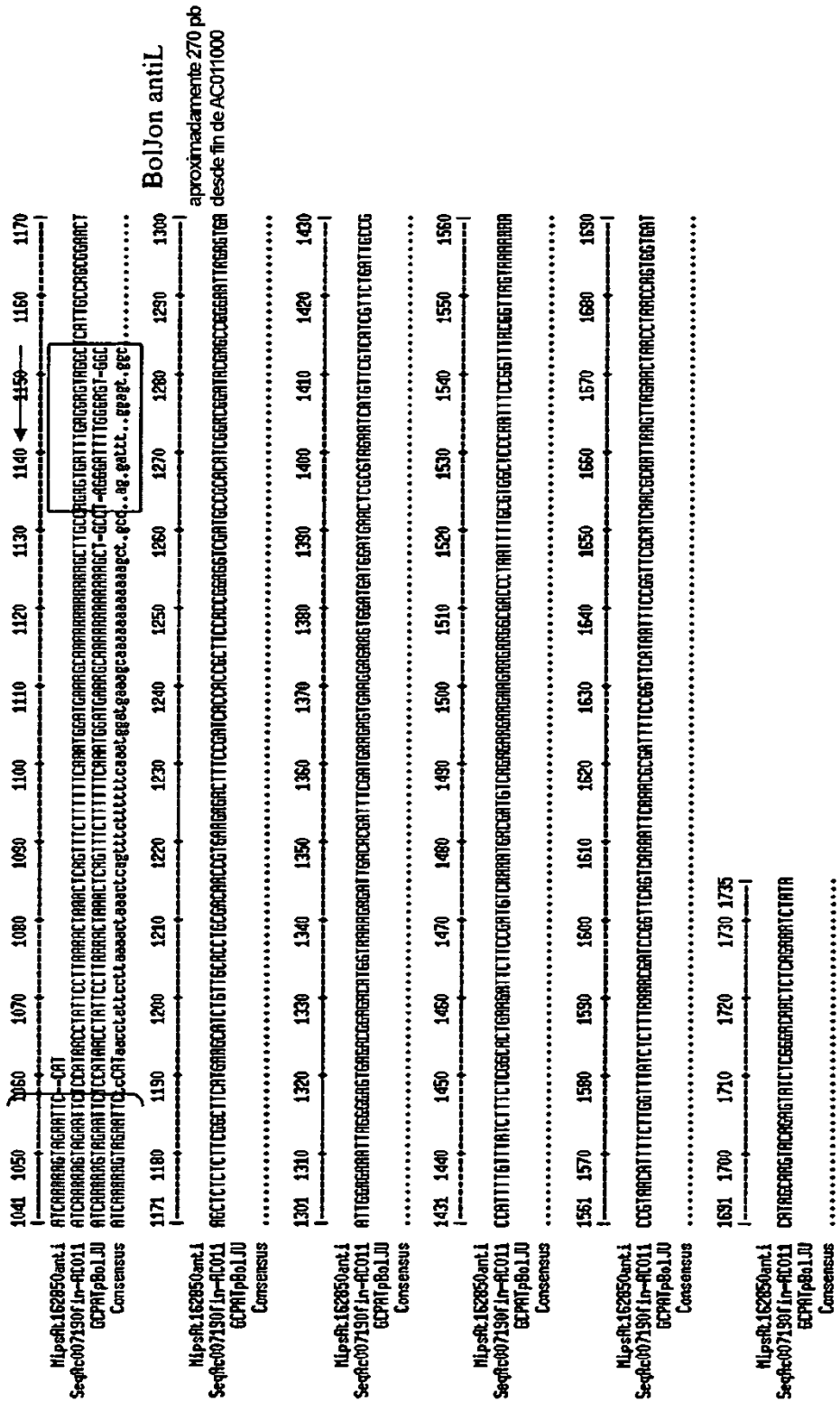


Figura 17 bis