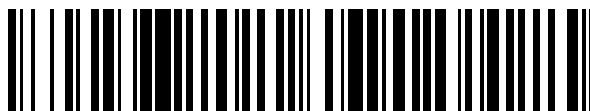


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 641**

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 10183322 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2298066**

54 Título: **Marcadores para su utilización en la 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:
30.03.2015

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (100.0%)
147, rue de l'Université
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 2 532 641 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 para su utilización en la producción de líneas restauradoras doble cero de *Brassica napus* con un buen valor agronómico.

5 La divulgación 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 portadora 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 divulgación se refiere también a un procedimiento de formación de semillas híbridas de *Brassica napus* y su descendencia. La presente invención se refiere a la utilización de marcadores para la selección y a la composición de estos marcadores.

15 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 erúxico 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.

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.

25 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.

30 Una primera divulgación 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 portadora 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:

- 35 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*,
- 40 b) irradiar antes de la meiosis las plantas heterocigóticas restauradas obtenidas en la etapa a) con radiación de rayos gamma,
- 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,
- 45 e) seleccionar líneas de descendencia.

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

50 La divulgación se refiere asimismo al procedimiento anterior, en el que la dosis de radiación en la etapa b) es 65 Gray durante 6 min.

En particular, la línea emc doble cero de *Brassica napus* primaveral de la etapa a) del procedimiento divulgado en la presente memoria es R211.

55 La R211 es una línea restauradora primaveral INRA.

La Drakkar es una variedad francesa de primavera registrada.

60 La Wesroona es una variedad australiana de primavera registrada.

Ventajosamente, la prueba del procedimiento divulgado en la presente memoria se realiza con la combinación de cinco marcadores seleccionados de entre PGIol, PGIUNT, PGIint, BolJon y CP418.

65 Otro objeto de la presente invención se refiere a las 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.

5 Ventajosamente, las líneas restauradoras doble cero divulgadas en la presente memoria presentan una combinación única de cinco marcadores seleccionados de entre PGIol, PGIUNT, PGIint, BolJon y CP418.

Otro objeto de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para formar plantas híbridas de *Brassica napus* y de su descendencia obtenidas por las etapas siguientes:

- 10 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,
- 15 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.

20 Otro objeto de la presente divulgación se refiere a las semillas de la planta *Brassica* obtenidas por los procedimientos divulgados en la presente memoria.

Todavía otro objeto de la divulgación se refiere a 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.

25 La presente invención se refiere a la utilización de cinco marcadores PGIol, PGIUNT, PGIint, BolJon y CP418, o cualquier parte de los mismos que comprende por lo menos un sitio polimórfico, 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 con un buen valor agronómico caracterizado por la fertilidad femenina, una buena tasa de transmisión de Rfo y un alto vigor vegetativo.

30 En la presente invención, la expresión "cualquier parte de los mismos que comprende por lo menos un sitio polimórfico" se refiere a cualquier parte de la secuencia que presenta por lo menos una diferencia entre la secuencia de tipo *B. oleracea* y la secuencia de tipo *B. rapa*.

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

Según una forma ventajosa de forma de realización, la presente invención se refiere a:

- 40 - El marcador PGIol que se amplía utilizando los cebadores: PGIol U y L PGIol:
(PGIol U: 5'TCATTTGATTGTTGCGCCTG3';
PGIol L: 5'TGTACATCAGACCCGGTAGAAAA3')
- 45 - El marcador PGIint que se amplía utilizando los cebadores: PGIint U y PGIint L:
(PGIint U: 5'CAGCACTAATCTTGCGGTATG3';
PGIint L: 5'CAATAACCCTAAAAGCACCTG3')
- 50 - El marcador PGIUNT que se amplía utilizando los cebadores: PGIol U y PGIint L:
(PGIol U: 5TCATTTGATTGTTGCGCCTG3';
PGIint L: 5'CAATAACCCTAAAAGCACCTG3')
- 55 - El BolJon marcador que se amplía utilizando los cebadores: BolJon U y BolJon L:
(BolJon U: 5'GATCCGATTCTTCTCCTGTTG3';
BolJon L: 5'GCCTACTCCTCAAATCACTCT3')
- 60 - 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*)
pCP418 L: 5'AATTTCTCCATCACAAGGACC3')

65 Otro objeto de la presente invención se refiere a los marcadores PGIol, PGIUNT, PGIint, BolJon y CP418 cuyas secuencias son las siguientes:

ES 2 532 641 T3

marcador PGIol R2000:

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| TCATTTGATT | GTTGCGCCTG | TCGCCTTGTT | GTGTTATGAT | GAATGAACAG | CAGTCATTTA | 60 |
| ACATGTGGTT | AACTTAACAG | GGCTCCGGCT | GTTGCAAAAC | ACATGGTTGC | TGTCAGCACT | 120 |
| AATCTTGGCG | TATGAATTTG | TGATTAAATT | TGTTTGTGTTG | TGACTCTTTC | TTCATTGTTT | 180 |
| GTTTTCGTAC | AATAAACCGA | ATGTATAATC | TTTTTACAAA | CTGAATTTTC | TACCGGGTCT | 240 |
| GATGTACA | | | | | | 248 |

5

marcador PGIUNT R2000:

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-----|
| TCATTTGATT | GTTGCGCCTG | TCGCCTTGTT | GTGTTATGAT | GAATGAACAG | CAGTCATTTA | 60 |
| ACATGTGGTT | AACTTAACAG | GGCTCCGGCT | GTTGCAAAAC | ACATGGTTGC | TGTCAGCACT | 120 |
| AATCTTGGCG | TATGAATTTG | TGATTAAATT | TGTTTGTGTTG | TGACTCTTTC | TTCATTGTTT | 180 |
| GTTTTCGTAC | AATAAACCGA | ATGTATAATC | TTTTTACAAA | TGAATTTTCT | ACCGGGTCTG | 240 |
| ATGTACAATG | CTAGTCTCCA | TGTTCTTGGG | GATCATGATT | TATTTTCTAC | ATGTATTTCAG | 300 |
| ACAGTACAGA | AGAAAGTGTT | CAAAACTCTG | GATGTTTTAA | TTTACAGTTA | GTGGAGAAGT | 360 |
| TCGGCATTGA | TCCGAACAAT | GCATTGTCAT | TTTGGGACTG | GGTTGGTGGG | AGGTACAGTG | 420 |
| GTAAGTGCTT | GTTTATTTGG | TTGTATAAAT | TTCTCGTCCA | TTTCCGCTTG | CTTAGTGTAT | 480 |
| AACTGAAATT | CTTTTGCAGT | TTGCAGTGCT | GTGGAGTCT | TACCATTGTC | TCTACAGTAT | 540 |
| GGCTTCTCTG | TGGTTGAGAA | GTACGGTACC | TTCTACTTTA | TCAGCCATCT | CATAAAATGT | 600 |
| CTTAGGCATA | TTCTTTCTAT | TTTATTTCCC | TCTTAATGAT | TTCTTCTTTT | TTTTATTGCA | 660 |
| TTCCCGTTTT | ATTTTCAAAA | GTTGTACTG | TCTCTAAATC | AAGAAGAAAC | CTTCTTAGTA | 720 |
| GATCCAGCTG | ATATTCAGCC | TTTTTTAAAT | TGGACTGCAG | GTTTTTAAAG | GGGAGCTTCA | 780 |
| AGCATTGATA | AGCATTTCGA | GTCCACACCG | TTTGAGAAGA | ATATACCCGT | GAGTTGCATT | 840 |
| AGTTGTGTGA | TTATACAGTT | TTCTTGTCTT | TTTGTATGTT | CCATCAACAC | TAGAGATTTCG | 900 |
| TGAAGTTATT | AGTGTAGTCA | ACGCATAGGG | AGAGGTGATT | GGTGACTTTT | GGACGATTTT | 960 |
| AGGTGCTTTA | GGGTTATTG | | | | | 979 |

10

marcador PGIint R2000:

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| CAGCACTAAT | CTTGCGGTAT | GAATTTGTGA | TTAAATTTGT | TTGTTTGTGA | CTCTTTCTTC | 60 |
| ATTGTTGTT | TTCGTACAAT | AAACCGAATG | TATAATCTTT | TACAAACTGA | ATTTTCTACC | 120 |
| GGGTCTGATG | TACAATGCTA | GTCTCCATGT | TCTTGGGGAT | CATGATTTAT | TTTCTACATG | 180 |
| TATTACAGACA | GTACAGAAGA | AAGTGTCAA | AACTCTGGAT | GTTTTAATTT | ACAGTTAGTG | 240 |
| GAGAAAGTTG | GCATTGATCC | GAACAATGCA | TTTGCAATTT | GGGACTGGGT | TGTTGGAAGG | 300 |
| TACAGTGGTA | AGTGCTTGTT | TATTTGGTTG | TATAAATTTT | TCGTCCATTT | CCGCTTGCTT | 360 |
| AGTGTATAAC | TGAAATTCCT | TTGCAGTTTG | CAGTGTCTGT | GGAGTCTTAC | CATTGTCTCT | 420 |
| ACAGTATGGC | TTCTCTGTGG | TTGAGAAGTA | CGGTACCTTC | TACTTTATCA | GCCATCTCAT | 480 |
| AAAAATGCTT | AGGCATATTC | TTTTCTATTT | ATTTCCCTCT | TAATGATTTT | TTCTTTTTTT | 540 |
| TATTCGATTC | CCGTTTTTAT | TTCAAAAGTT | GTTACTGTCT | CTAAATCAAG | AAGAAACCTT | 600 |

15

marcador BolJon R2000:

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| GATCCGATTC | TTCTCCTGTT | GAGATCAGCT | CCAAACATCA | AACAACCTGT | ACACAAATAT | 60 |
| CTTTACTTGC | TAAATGGAAC | ATGACAAGAG | ATAGAAAATC | TTGCTCATAG | TATTGTACAA | 120 |
| GGGATAACAG | TGTAGAAAAC | AAACCGTCTG | TAAGATTTTC | TCCCTGATCC | TCTCACTTAA | 180 |
| CCAGTAGGGT | TTTTTACAT | TGAAGCGCAT | ATCTACTTTG | GTATTCACTG | AATAAAAAAA | 240 |
| GAAAGCTGGT | AACATGTGAA | GGATATACAA | GCATTGATAC | ACCAAGTAGT | CACAAACTAC | 300 |
| ATTATAAAGG | TCAGACCTTT | GTTACATTC | TGGCCTCCAG | GACCACCGCT | TCTAGCAAAG | 360 |
| TTAAGCGTAA | CATGGTCTGC | ACGTATACAA | ATGAAAATGT | TTCTATCAAA | ATCCTATAAA | 420 |
| ATAGAGCTCT | ATAACATTGT | CGATACATAG | TTTCACTAAC | TCTGCAAGTA | CTAAACACAT | 480 |
| ATACAAACAA | AACTATGCGA | ACAGATCAAA | ACTACTACAG | AACACAGTTC | TATGACACTG | 540 |
| TCCGATAGTAA | CATCCTCTGC | AAGTACCAAA | GAGATAGCAA | ATGAAACTAT | GTAACAAAAT | 600 |
| CAAAATTCCTA | AATTTCTCCA | TCACAAGGAC | CTACAGAATA | GAGTTATCAT | AACATTTTCT | 660 |
| GTAATATTTT | CCATCAAAAT | GACTAGAGAA | CAGAGTTCTT | ATAACATTAT | CTGTAATATG | 720 |
| TCCAACAAA | CCACTACATA | GCAGAGTTCT | TATAACATTG | TCTGTAATG | TCCAATCAAA | 780 |
| ACCACTACAG | AACAAAGCTC | CTATAACATT | GTTTATACAA | AGTTTCACTA | AATCTACAAA | 840 |
| CTTTCCCGT | AAATGAGCTT | AATATCACCC | AAAGATGTTT | CAATCAGATA | AAGAGTACGA | 900 |
| CATCGTTTTG | AGATTAGAAC | AAACTGAAAC | TTACGTAGAG | TGATTTGAGG | AGTAGGC | 957 |

marcador CP418L R2000:

ES 2 532 641 T3

```

AATTTCTCCA TCACAAGGAC CTACAGAATA GAGTTATCAT AACATTTTCT GTAAATATTT 60
CCATCAAAAT GACTAGAGAA CAGAGTTCTT ATAACATTAT CTGTAAATGT TCCAACAAAA 120
CCACTACATA GCAGAGTTCT TATAACATTG TCTGTAAATG TCCAATCAAA ACCACTACAG 180
AACAAAGCTC CTATAACATT GTTTATACAA AGTTTCACTA AATCTACAAA CTTTCCCCGT 240
AAATGAGCTT AATATCACCC AAAGATGTTT CAATCAGATA AAGAGTAACG 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 GAGTGGCACG 540
ATTCGACGA AGAGTGAAG AGGAGAGGGT GGTGGATAAA CTCGCGTATG ATCAAGTTCG 600
TCATCGTCCT GATTGCCGCC ATTTTTTTTG TCAGGGCGCT CTGTGGCTTA GAAGTTTCCG 660
ATGTCAATGA AC 672
    
```

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 |

- 5
- La figura 1 ilustra la irradiación con rayos gamma y la producción de F2.
 - La figura 2 ilustra semillas colocadas en 'R211' y 'R2000'.
- 10
- 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:
- 15
- 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).
- 20
- 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.
- 25
- La figura 7 ilustra la digestión del producto de RCP PGIol por Msel.
- En esa figura:
- 30
- Sam y Darm tienen una banda de 75 pb.
 Drak, R211.Dk y R2000 mostraron 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.
- 35
- 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'.
- 40
- 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.
- 45
- 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.

- 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.

- 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).

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.

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*.

- 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.

Ejemplo I: Procedimiento de producción de una línea restauradora doble cero de *Brassica napus* para esterilidad masculina citoplasmática (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:

Genotipos: La línea 'R211' con una inserción de rábano suprimida se cruzó con semillas de colza 'Drakkar' con pocos 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*.

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.

5 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).

10 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):

- 15
- 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).

20 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.

25 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.

30 Procedimiento:

35 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. *10th 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.

40 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.

45 Resultados:

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

50 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.

55 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.

60 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

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 distinguan 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

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:

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.

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.

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.

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:

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):

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*.

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.

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 PGIint de los otros genotipos probados de colza, homólogos a *B. rapa* cv Askó (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 coampliaron 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 cóntigo adyacente a *Arabidopsis* (AC07190).

A partir de *Brassica* Crop Net DB, se descubrió un clon de *B. oleracea*, (EMBH448336, 764 pb) que arremete contra el comienzo de la A011000, y un segundo clon de *B. oleracea* (EMBH53971), 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 cóntigos.
- 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* (EMBH53971 y EMBH448336) 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 coamplían 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.

- 5 - 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.
- 10 - 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).
- 15 - 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 EMBH448336. Este marcador estaba en una secuencia de ADN muy conservada que no permite no polimorfismo entre genotipos, excepto por presencia / ausencia.
- 20 - 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*.

25 En la presente divulgación, 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".

30 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.

35 Las secuencias del marcador PGIol y del marcador PGIUNT en líneas restauradas RRH1 y R113 eran homólogas a las de *B. rapa* cv Askó. En 'R2000', la secuencia PGIUNT es homóloga a la de *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.

40 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*.

45 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.

50 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

- 55 <110> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)
- <120> Procedimiento de producción de líneas restauradoras doble cero de *Brassica napus* con buen valor agronómico
- 60 <130> D21413
- <140> EP 04744142.3
- <141> 2004-07-05
- 65 <150> EP 03291677.7
- <151> 2003-07-04

ES 2 532 641 T3

5 <150> EP 03293057.0
 <151> 2003-12-08

<150> EP 09175998.5
 <151> 2009-11-13

10 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.2

15 <210> 1
 <211> 248
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

20 <220>
 <223> Marcador PGlo1

<400> 1

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

25 <210> 2
 <211> 979
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

30 <220>
 <223> Marcador PGI-UNT

<400> 2

35

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-----|
| tcatttgatt | gttgcgcctg | tcgccttggt | gtgttatgat | gaatgaacag | cagtcattta | 60 |
| acatgtgggt | aacttaacag | ggctccggct | gttgcaaac | acatggttgc | tgtcagcact | 120 |
| aatcttgcgg | 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 | gcatttgcat | tttgggactg | ggttgggtga | aggtacagtg | 420 |
| gtaagtgtct | gtttatttgg | ttgtataaat | ttctcgtcca | tttccgcttg | cttagtgat | 480 |
| aactgaaatt | cttttgcagt | ttgcagtget | gttggagtct | taccattgtc | tctacagtat | 540 |
| ggcttctctg | tggttgagaa | gtacgggtacc | ttctacttta | tcagccatct | cataaaatgt | 600 |
| cttaggcata | ttctttctat | tttatttccc | tcttaatgat | ttcttctttt | ttttattgca | 660 |
| ttcccgtttt | attttcaaaa | gttgttactg | tctctaaaatc | aagaagaaac | cttcttagta | 720 |
| gatccagctg | atattcagcc | ttttttaa | 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 |

40 <210> 3
 <211> 866
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

45 <220>
 <223> Marcador PGI-int

<400> 3

ES 2 532 641 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| 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 | tggtggaagg | 300 |
| tacagtggtg | agtgcttggt | tatttggttg | tataaatttc | tcgtccattt | ccgcttgctt | 360 |
| agtgtataac | tgaaattctt | ttgcagtttg | cagtgtctgt | ggagtcttac | cattgtctct | 420 |
| acagtatggc | ttctctgtgg | ttgagaagta | cggtaccttc | tactttatca | gccatctcat | 480 |
| aaaatgtctt | aggcatatcc | tttctathtt | atctccctct | taatgatttc | ttcttttttt | 540 |
| tattgcattc | cogttttatt | ttcaaaaagt | gttactgtct | ctaaatcaag | aagaacctt | 600 |
| cttagtagat | ccagctgata | ttcagccttt | tttaaatgg | actgcaggtt | tttaagggg | 660 |
| agcttcaagc | attgataagc | atctccagtc | cacaccgttt | gagaagaata | taccctgag | 720 |
| ttgcattagt | tgtgtgatta | tacagttttc | ttgtcttttt | gctatgtcca | tcaacactag | 780 |
| agattcgtga | agttattagt | gtagtcaacg | catagggaga | ggtgatggg | gacttttgga | 840 |
| cgatttcagg | tgcttttagg | ttattg | | | | 866 |

5 <210> 4
 <211> 957
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

10 <220>
 <223> Marcador BolJon

<400> 4

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gatccgattc | ttctcctggt | gagatcagct | ccaacatca | aacaacttgt | acacaaatat | 60 |
| ctttacttgc | taaatggaac | atgacaagag | atagaaaatc | ttgctcatag | tattgtacaa | 120 |
| gggataaacg | tgtagaaaac | aaaccgtctg | taagattttc | tccctgatcc | tctcacttaa | 180 |
| ccagtaggcg | tttttccat | tgaagcgcg | atctactttg | gtattcactg | aataaaaaaa | 240 |
| gaaagctgg | aacatgtgaa | ggatatacaa | gcattgatac | accaagtagt | cacaaactac | 300 |
| attataaagg | tcagaccttt | gttcacattc | tgccctccag | gaccaccgct | tctagcaaa | 360 |
| ttaagcgtaa | catggtctgc | acgtatacaa | atgaaaatgt | ttctatcaaa | atcctataaa | 420 |
| atagagctct | ataacattgt | cgatacatag | tttctactac | tctgcaagta | ctaaacacat | 480 |
| atacaaaaac | aactatgcga | acagatcaaa | actactacag | aacacagttc | tatgacactg | 540 |
| tcgatagtaa | catcctctgc | aagtaccaa | gagatagcaa | atgaaactat | gtaaacaat | 600 |
| caaaattcta | aatttctcca | tcacaaggac | ctacagaata | gagttatcat | aacattttct | 660 |
| gtaaatattt | ccatcaaaa | gactagagaa | cagagttctt | ataacattat | ctgtaaatgt | 720 |
| tccaacaaaa | ccactacata | gcagagttct | tataacattg | tctgtaaatg | tccaatcaaa | 780 |
| accactacag | aaaagagctc | ctataacatt | gtttatacaa | agtttacta | aatctacaaa | 840 |
| ctttccccgt | aatgagctt | aatatcacc | aaagatgttt | caatcagata | aagagtacga | 900 |
| catcgttttg | agattagaac | aaactgaaac | ttacgtagag | tgatttgagg | agtaggc | 957 |

15 <210> 5
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

20 <220>
 <223> Marcador CP418L

<400> 5

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| aatttctcca | tcacaaggac | ctacagaata | gagttatcat | aacattttct | gtaaatattt | 60 |
| ccatcaaaa | gactagagaa | cagagttctt | ataacattat | ctgtaaatgt | tccaacaaaa | 120 |
| ccactacata | gcagagttct | tataacattg | tctgtaaatg | tccaatcaaa | accactacag | 180 |
| aacaaagctc | ctataacatt | gtttatacaa | agtttacta | aatctacaaa | ctttccccgt | 240 |
| aatgagctt | aatatcacc | aaagatgttt | caatcagata | aagagtaacg | acatcgtttt | 300 |
| gagattagaa | aaactgaaa | cttacgtaga | gtgatttgag | gagtaggctc | gttgccagca | 360 |
| gagctagctc | tctctccgc | ctcatgaagc | atctgttgca | cctgagacaa | ccgtgacgaa | 420 |
| actttccgat | caccgccacc | agaattcgac | gccgcgcac | ggaaggatcc | gaatcgggaa | 480 |
| ctgagtgaac | ccgagcgatc | ccgggagtg | gacggagcga | tggaagaa | gagtgccagc | 540 |
| atctcgacga | agagtggaag | aggagagggt | ggtggataaa | ctcgcgtatg | atcaagtctg | 600 |
| tcacgtctct | gattgccgcc | attttttttg | tcagggcgct | ctgtggctta | gaagtctccg | 660 |
| atgtcaatga | ac | | | | | 672 |

REIVINDICACIONES

1. Composición de cinco marcadores, siendo dichos marcadores PGIol, PGIUNT, PGIint, BolJon y CP418, en la que el marcador PGIol presenta la secuencia de SEC ID nº: 1, el marcador PGIUNT presenta la secuencia de SEC ID nº: 2, el marcador PGIint presenta la secuencia de SEC ID nº: 3, el marcador BolJon presenta la secuencia de SEC ID nº: 4, y el marcador CP418 presenta la secuencia de SEC ID nº:5.
2. Utilización de la composición de los cinco marcadores según la reivindicación 1, para detectar unas líneas restauradoras doble cero recombinadas de *Brassica napus* para la emc Ogura que presentan una introgresión de rábano portadora del gen restaurador Rfo de la fertilidad masculina suprimido del alelo Pgi-2 de isoenzima de rábano y recombinado con el gen Pgi-2 de *Brassica oleracea*, y que presentan un buen valor agronómico de la fertilidad femenina, una buena tasa de transmisión de Rfo y un vigor vegetativo elevado.
3. Utilización según la reivindicación 2, que comprende ampliar dichos cinco marcadores según la reivindicación 1.

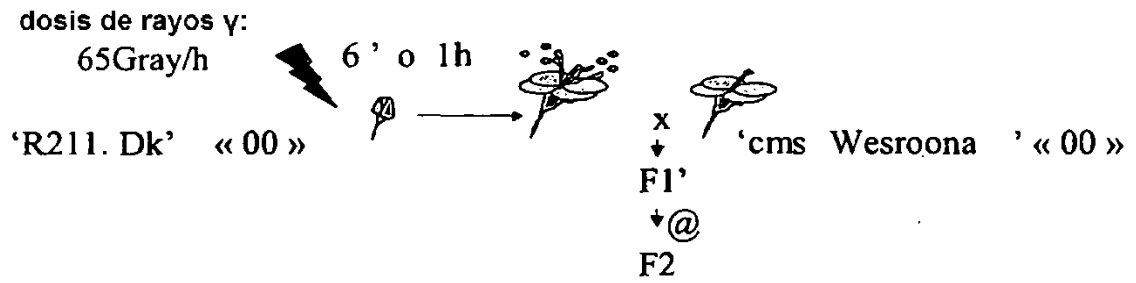


Figura 1

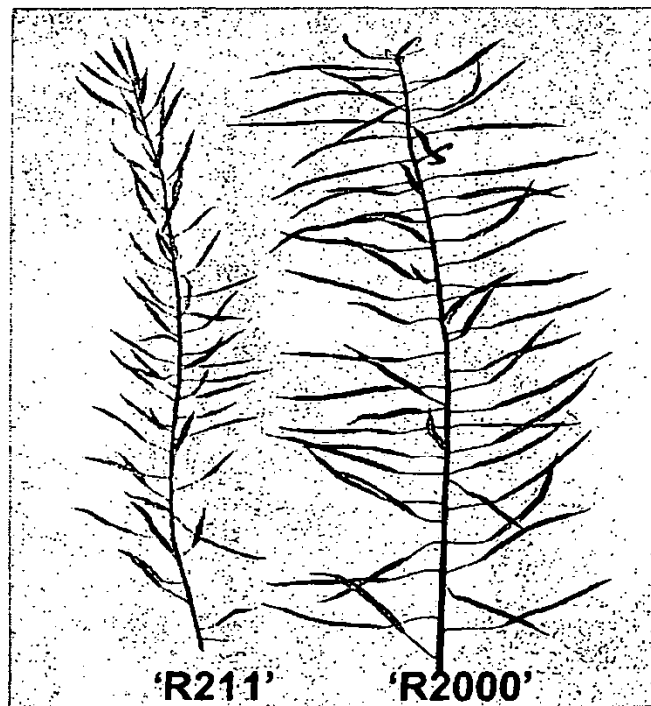


Fig. 1: Semilla colocada en 'R211' y 'R2000'

Figura 2

| Genotipo | Autopolinizaciones | Cruces de prueba |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| Drakkar | 29.3 | |
| Pactol | 23.1 | |
| R211 | 11.2 | 25.5 |
| R2000 | 26.5 (24.0 – 31.1) | 27.0 (24.0 – 28.7) |

Figura 3

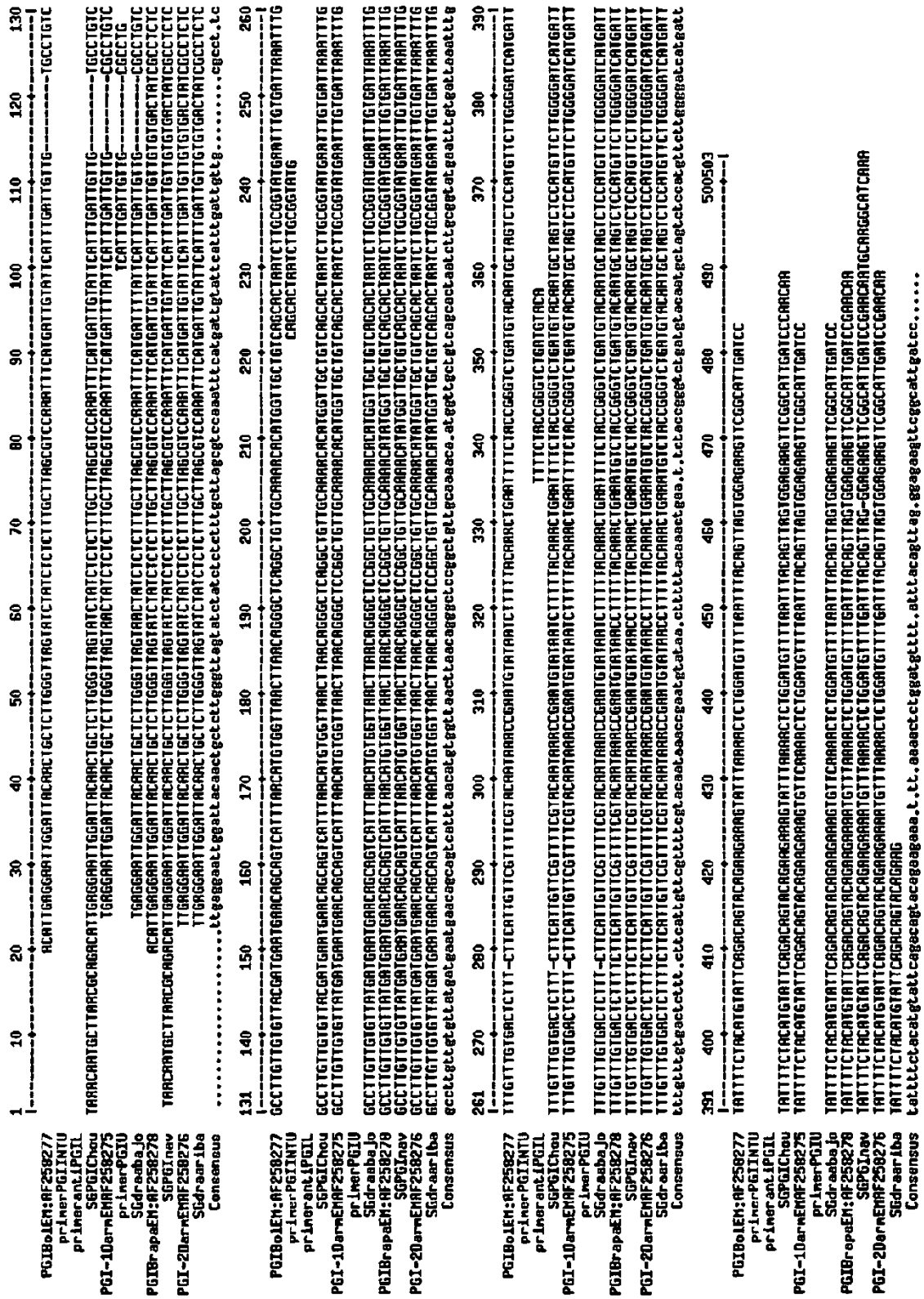


Figura 4

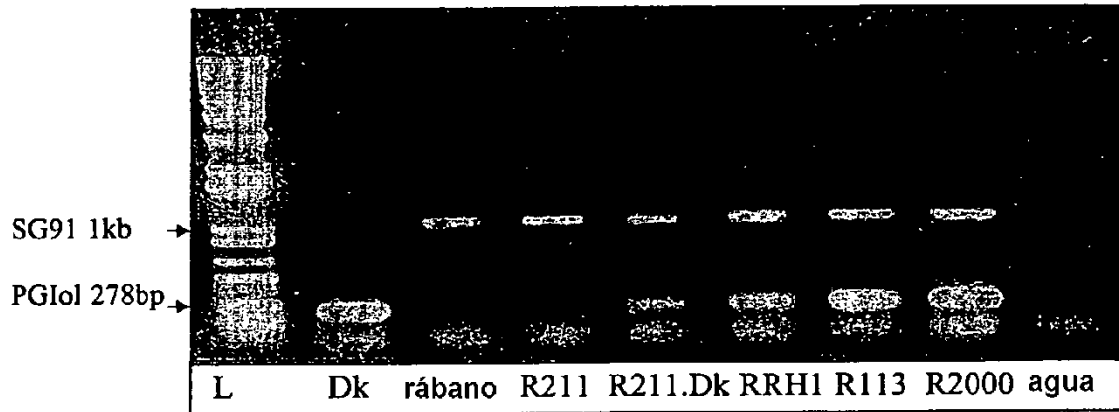


Figura 5

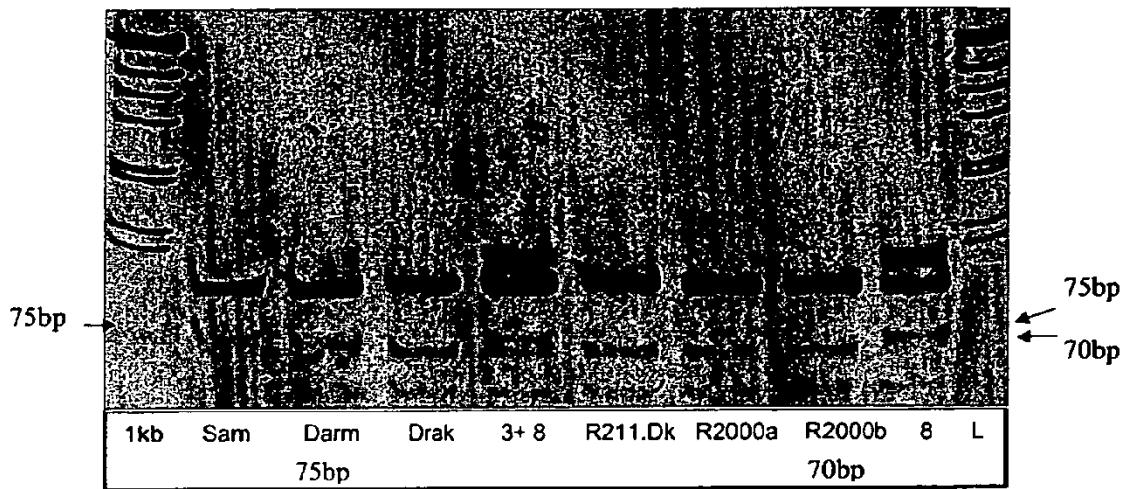


Figura 7

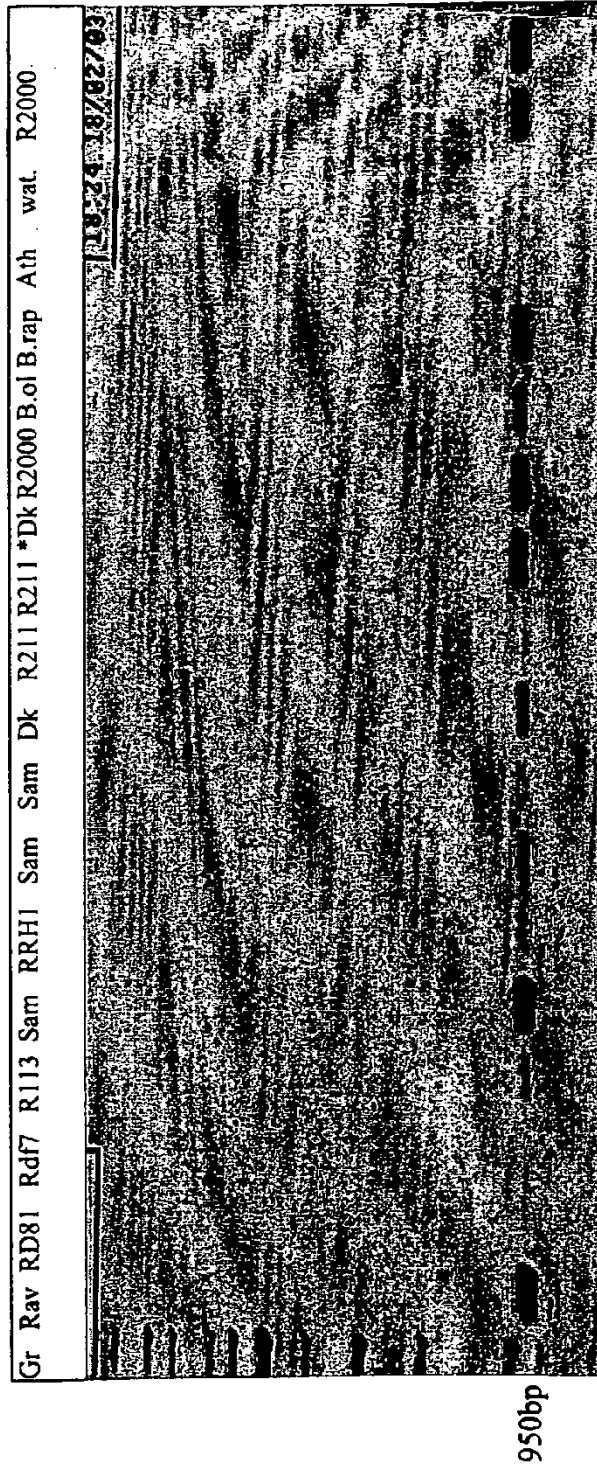


Figura 8

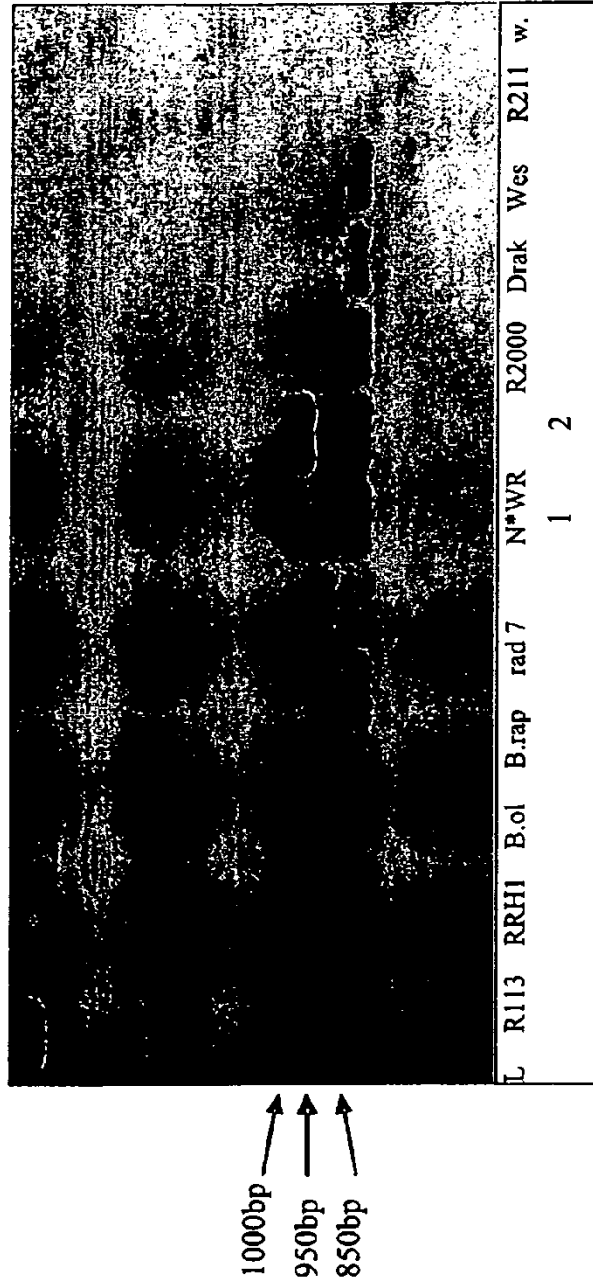


Figura 9

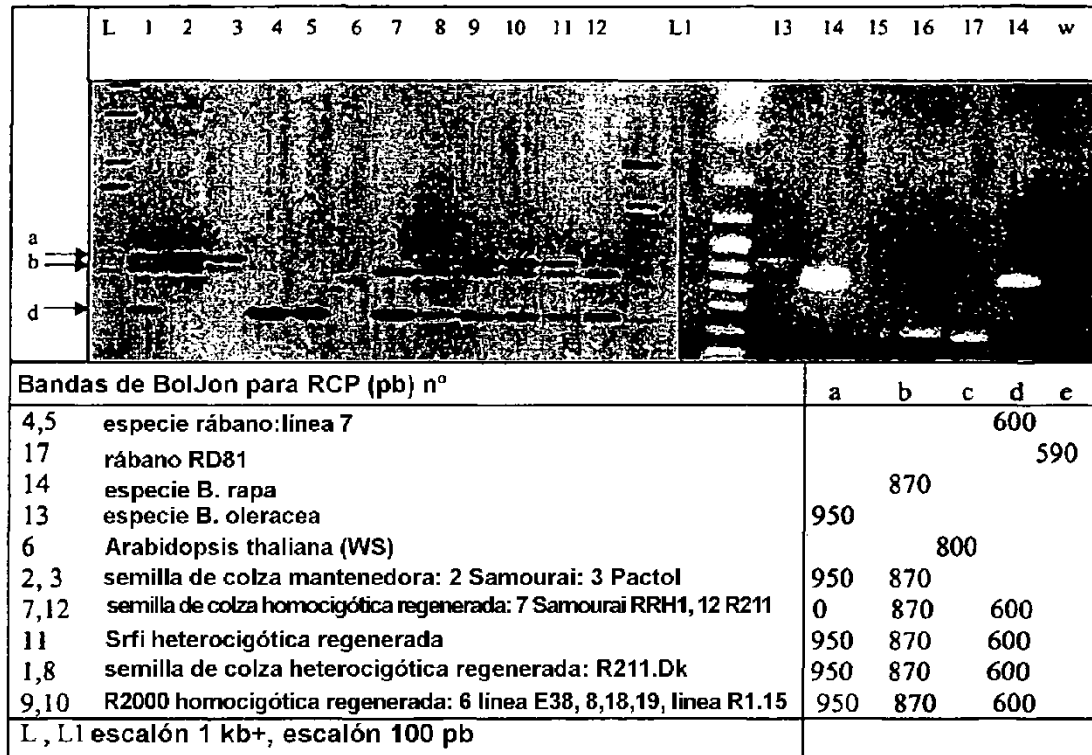
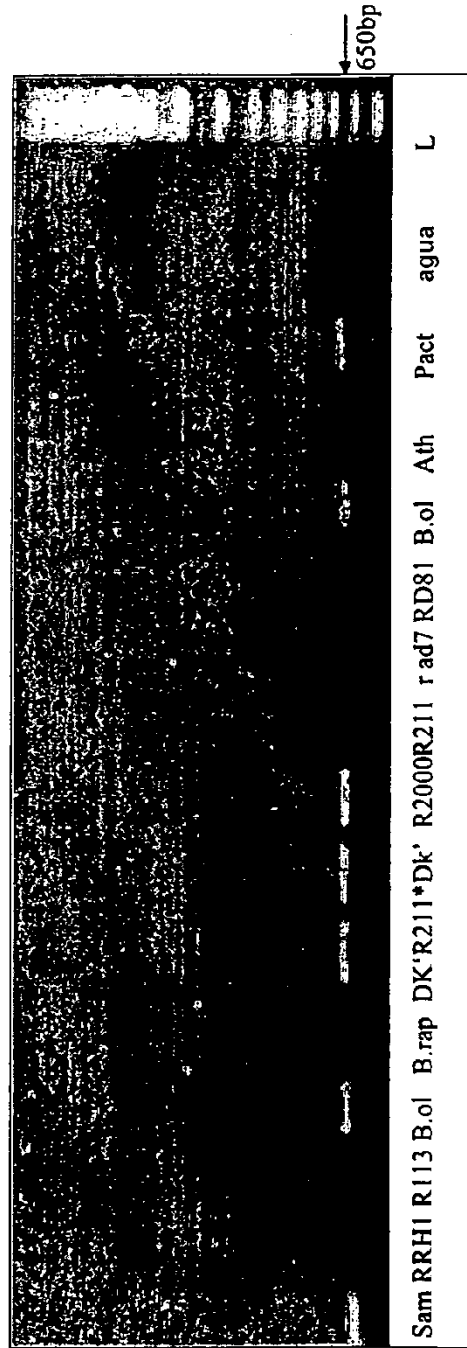


Figura 10



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 .....GCCTGTTTG TGTATGATG AAT.GAACAG CAGTCATTTA
consePGIintUNTR113 .....GCCCGGTTG .....G TAT.GAAACG CAG.CATTTA
consePGIintUNTBrapaA .....G CAGTCATTTA
ConsePGIintUNTRRH1 .....CG TGTGAGAAG CAG.CATTTA
PGIBo-EM:AF258277 .....CCTG TCGCCTTGTTG TGTTA.GATG AAT.GAACAG CAGTCATTTA
PGIBra-EM:AF258278 TATCGCCTC. TCGCCTTGTTG TGTTATGATG AAT.GAACAG CAGTCATTTA
consePGIintUNTBolera .....
consePGIintUNTR2000 .....CCTG TCGCCTTGTTG TGTTATGATG AAT.GAAC. CAGTCATTTA
Consensus .....t.g .....g ...t.gaa.ag cagtcattta

151                                     * MseI restriction site 200
consePGIintUNTDrakka ACATG.TGGT TAACCTAACA GGGCTCCGGC TGTGCAAAA CACATGGTTG
consensWesrPGI ACATG.TGGT TAACCTAACA GGGCTCCGGC TGTGCAAAA CACATGGTTG
consePGIintUNTR113 ACATG.TGGT .AACTGAACA GGGCTCCGGC TGTGCCC.. CTAAGGGTTG
consePGIintUNTBrapaA ACATGGTGGT TAACCTGAACA GGGCTCCGGC TGTGCAAAA CACATGGTTG
ConsePGIintUNTRRH1 ACATG..GGT ..ACTGAACA GGC.CCGGC TGTGCAA.. .ACAG...TG
PGIBo-EM:AF258277 ACATG.TGGT TAACCTAACA GGGCTCAGGC TGTGCAAAA CACATGGTTG
PGIBra-EM:AF258278 ACATG.TGGT TAACCTAACA GGGCTCCGGC TGTGCAAAA CATATGGTTG
consePGIintUNTBolera .....C TGTGCAAAA CACATGGTTG
consePGIintUNTR2000 ACATG.TGGT TAACCTAACA GGGCTCCGGC TGTGCAAAA CACATGGTTG
Consensus acatg.tggt taactaaca gggctccggc tgtgcaaaa cacatggtg
2 0 0

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

251                                     300
consePGIintUNTDrakka TGTGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC CGAATGTATA
consensWesrPGI TGTGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC CGAATGTATA
consePGIintUNTR113 TGCGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC ..AATGTATA
consePGIintUNTBrapaA TGCGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC ..AATGTATA
ConsePGIintUNTRRH1 TGCGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC ..AATGTATA
PGIBo-EM:AF258277 TGTGACTCTT T.CTTCATTG TTCGTTTTCG TACAATAAAC CGAATGTATA
PGIBra-EM:AF258278 TGTGACTCTT TTCTTCATTG 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
0 03

```

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)

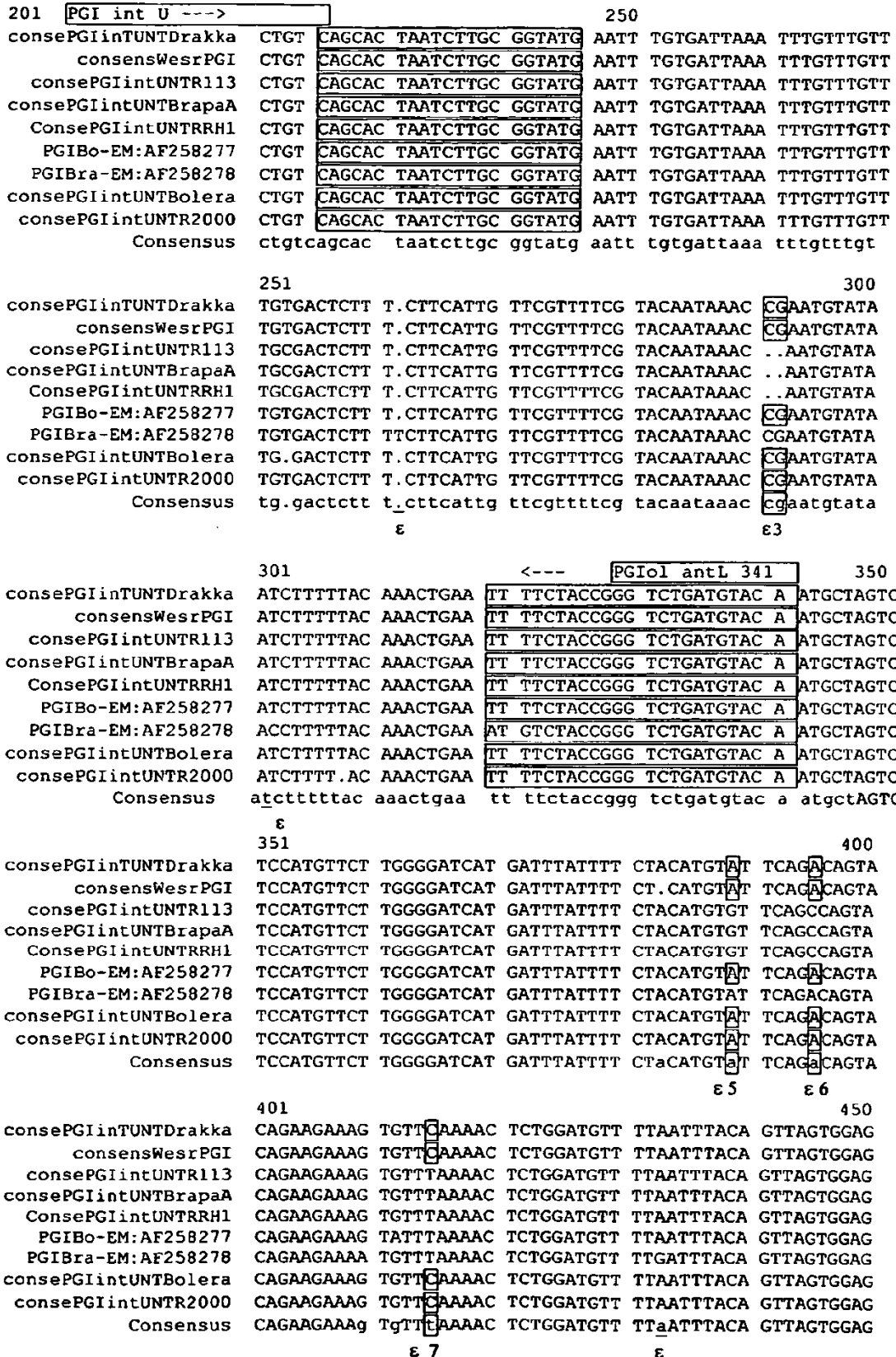


Figura 14 (a)



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 | ttcctctt.aa | 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 | tgatttcccg | ttttattttc | aaaagttgt. | actgtctcta | aatcaagaag |
| | | | | | |
| | 801 | | | | 850 |
| consePGIintUNTDrakka | AAACCTTCTT | AGTAGATCCA | GTTGATATTC | AGCCTTTTCT | AAATTGGACT |
| consensWesrPGI | AAACCTTCTT | AGTAGATCCA | GTTGATATTC | 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 | GTTGATATTC | AGCCTTTTCT | AAATTGGACT |
| Consensus | aaaccttctt | agtagatcca | gttgatattc | agccttttct | aaattggact |
| | | | 18 | | 19 |
| | 851 | | | | 900 |
| consePGIintUNTDrakka | GCAGGTTTTT | AAA.GGGAGC | TTCAAGCATT | GATAGCATT | TCCAGTCCCC |
| consensWesrPGI | GCAGGTTTTT | AAA.GGGAGC | TTCAAGCATT | GATAGCATT | 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 | GATAGCATT | TCCAGTCCAC |
| consePGIintUNTR2000 | GCAGGTTTTT | AAACGGGAGC | TTCAAGCATT | GATAGCATT | TCCAGTCCAC |
| Consensus | gcaggTTTTT | aaa.gggagc | ttcaagcatt | gatagcatt | tccagtcc.c |
| | | | | 20 | |
| | 901 | | | | 950 |
| consePGIintUNTDrakka | ACC.GTTTGA | GAAGAATATA | CCCGTGAGTT | GCATTAGTT | GTGTGATTAT |
| consensWesrPGI | ACC.GTTTGA | GAAGAATATA | CCCGTGAGTT | GCATTAGTT. | GTGTGATTAT |
| consePGIintUNTR113 | .CCCGTTTGA | GAAGAATATA | CCCGTGAGTT | GCATTAGTT. | .GTGTGATTAT |
| consePGIintUNTBrapaA | .CCCGTTTGA | GAAGAATATA | CCCGTGAGTT | GCATTAGTT. | GTGTGATTAT |
| ConsePGIintUNTRRH1 | ACC.GTTTGA | GAAGAATATA | CCCGTGAGTT | GCATTAGTT. | GTGTGATTAT |
| PGIBo-EM:AF258277 | | | | | |
| PGIBra-EM:AF258278 | | | | | |
| consePGIintUNTBolera | ACCCGTTTGA | GAAGAATATA | CCCGTGAGTT | GCATTAGTT. | GTGTGATTAT |
| consePGIintUNTR2000 | ACC.GTTTGA | GAAGAATATA | CCCGTGAGTT | GCATTAGTT. | GTGTGATTAT |
| Consensus | acc.gtttga | gaagaatata | cccgtgagtt | gcattagtt. | gtgtgattat |

Figura 14 (c)

| | | | | | |
|----------------------|------------|----------------|------------|------------|-------------|
| | 951 | | | | 1000 |
| consePGIintUNTDrakka | ACAGTTTTTC | TTGTCTTTTT | GCTATGCCCA | TCAACACTAG | AAGATTCGTTG |
| consensWesrPGI | ACAGTTTT.C | TTGTCTTTTT. | GCTATGTCCA | TCAACACTAG | A.GATTCGTTG |
| consePGIintUNTR113 | ACAGTTTT.C | TTGCCTTTTT | GCTAT..AGG | GCAAC.CTAG | A.GATTCATG |
| consePGIintUNTBrapaA | ACAGTTTT.C | TTGTCTTTTT. | 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.GATTCGTTG |
| consePGIintUNTR2000 | ACAGTTTT.C | TTGTCTTTTT | GCTATGTCCA | TCAACACTAG | A.GATTCGTTG |
| Consensus | acagtttt.c | ttgtcttttt | gctat....a | tcaac.ctag | a.gattc.tg |
| | | | | | 21 |
| | | | | | |
| | 1001 | | | | 1050 |
| consePGIintUNTDrakka | AAGTTATTAG | TGTAGCCAAC | GCCTAGGGGG | AGGTTGTTG | GCTGTTTTGG |
| consensWesrPGI | AAGTTATTAG | TGTAGTCAAC | GCA..... | | |
| consePGIintUNTR113 | AAGTTATTAG | TGTAGTCAAC | GCAGAGGAGA | G..TTCACTG | ACGG..... |
| consePGIintUNTBrapaA | 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 | TGACTTTTGG |
| Consensus | aagttattag | tgtagtcaac | gca.agg.g. | .g..... | |
| | | | | | |
| | 1051 | | 1076 | | |
| consePGIintUNTDrakka | ACGTTTTTAC | GTGCTCCGGG | GGGTTTTTGG | GGACCAAACC | CCCAAC |
| consensWesrPGI | | | | | |
| consePGIintUNTR113 | | | | | |
| consePGIintUNTBrapaA | | | | | |
| ConsePGIintUNTRRH1 | | | | | |
| PGIBo-EM:AF258277 | | | | | |
| PGIBra-EM:AF258278 | | | | | |
| consePGIintUNTBolera | | | | | |
| consePGIintUNTR2000 | ACGATTT | CAG GTGCTTTAGG | GTTATTG | | |

Figura 14 (d)

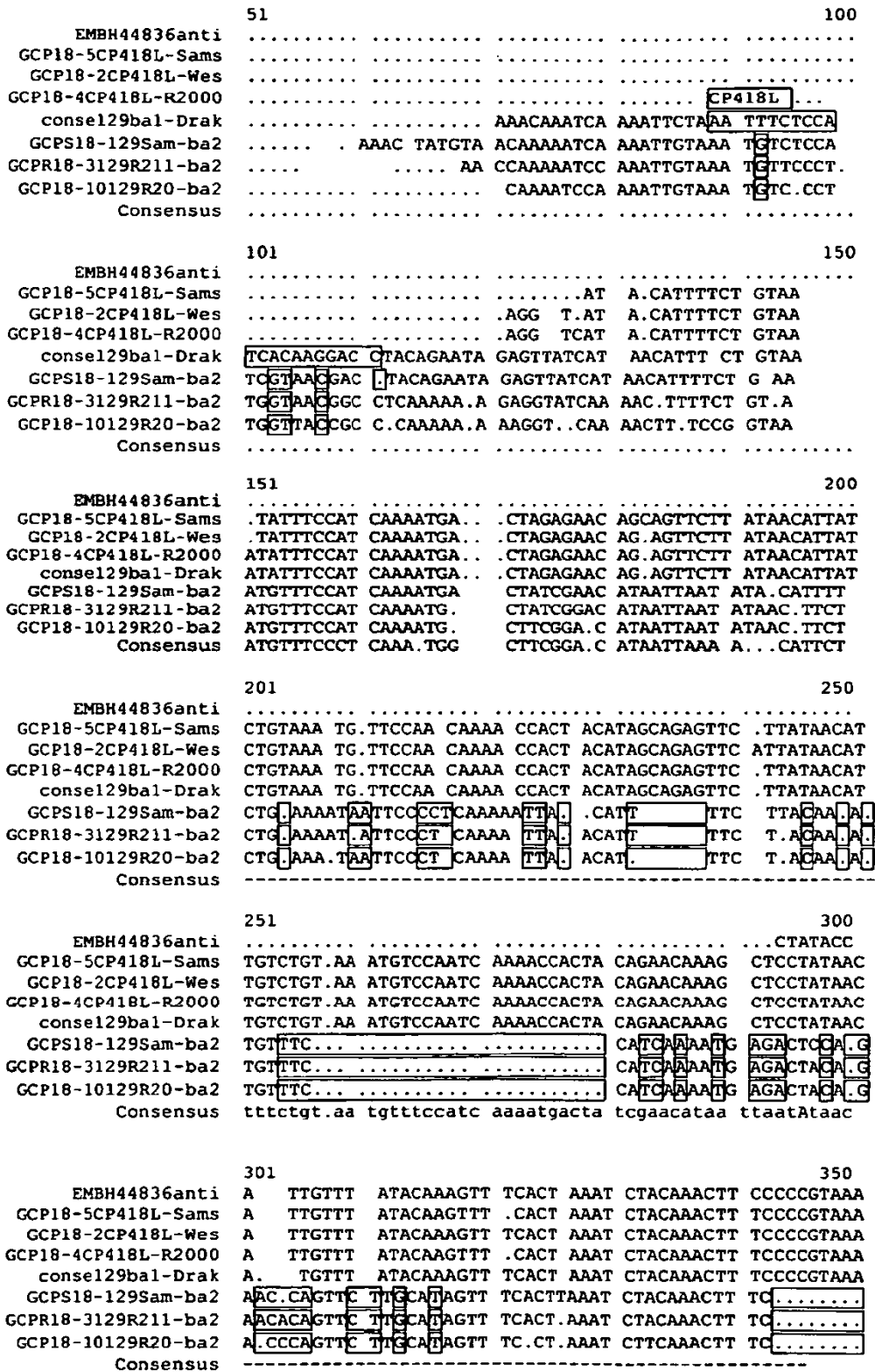


Figura 15 (a)

```

351                                     400
EMBH44836anti TGAGCTTAAT ATCACCCAA. GATGTTTCA ATCAGAT AAA GAGTAACGAC
GCP18-5CP418L-Sams TGAGCTTAAT ATCACCCAAA GATGTTTCA ATCAGAT AAA GAGTAACGAC
GCP18-2CP418L-Wes TGAGCTTAAT ATCACCCAAA GATGTTTCA ATCAGAT AAA GAGTAACGAC
GCP18-4CP418L-R2000 TGAGCTTAAT ATCACCCAAA GATGTTTCA ATCAGAT AAA GAGTAACGAC
conse129ba1-Drak TGAGCTTAAT ATCACCCAAA GATGTTTCA ATCAGAT AAA GAGTA.CGAC
GCPS18-129Sam-ba2 .....AAT CTTATCTTAAA G.TTATCAC ATCACAT GAA GA.....
GCP18-3129R211-ba2 .....AAT CTTATCTTAA. G.TTATCAC ATCACAT GAA GA.....
GCP18-10129R20-ba2 .....AAT CTTATCTTAAA G.TTATCAC ATCACAT GAA GA.....
Consensus -----
401
EMBH44836anti ATCGTTTTGA GATTAGAACA AA
GCP18-5CP418L-Sams ATCGTTTTGA GATTAGAACA AA
GCP18-2CP418L-Wes ATCGTTTTGA GATTAGAACA AA
GCP18-4CP418L-R2000 ATCGTTTTGA GATTAGAACA AA
conse129ba1-Drak ATCGTTTTGA GATTAGAACA AA
GCPS18-129Sam-ba2 .....GAGC AA
GCP18-3129R211-ba2 .....GAGC AA
GCP18-10129R20-ba2 .....GAGC A.
Consensus -----
431                                     480
EMBH44836anti CTGAAACTTA CGTAGAGTGA TTTGAGGAGT AGGCTCGTTG CCAGCAGAGC
GCP18-5CP418L-Sams CTGAAACTTA CGTAGAGTGA TTTGAGGAGT AGGCTCGTTG CCAGCAGAGC
GCP18-2CP418L-Wes CTGAAACTTA CGTAGAGTGA TTTGAGGAGT AGGCTCGTTG CCAGCAGAG.
GCP18-4CP418L-R2000 CTGAAACTTA CGTAGAGTGA TTTGAGGAGT AGGCTCGTTG CCAGCAGAGC
conse129ba1-Drak CTGAAACTTA CGTAGAGTGA TTTGAGGAGT AGGCTCGTTG CCAGCAGAGC
GCPS18-129Sam-ba2 GTTAAACTTA CTTAGAGTGA TTTGAGGAGT AGGCTCGTTG CCAGCGGAGC
GCP18-3129R211-ba2 GTTAAACTTA CTTAGAGTGA TTTGAGGAGT AGGCTCGTTG CCAGCGGAGC
GCP18-10129R20-ba2 GTTAAACTTA CTTAGAGTGA TTTGAGGAGT AGGCTCGTTG CCAGCGGAGC
Consensus .t.aa.ctta c.tagagtga t.tgaggagt aggctcgttg ccagc.gagc
481                                     530
EMBH44836anti TAGTCTCTC CTCCGCCTCA TGAAGCATCT GTTGACCTG AGACAACCGT
GCP18-5CP418L-Sams TAGTCTCTC CTCCGCCTCA TGAAGCATCT GTTGACCTG AGACAACCGT
GCP18-2CP418L-Wes TAGTCTCTC CTCCGCCTCA TGAAGCATCT GTTGACCTG AGACAACCGT
GCP18-4CP418L-R2000 TAGTCTCTC CTCCGCCTCA TGAAGCATCT GTTGACCTG AGACAACCGT
conse129ba1-Drak TAGTCTCTC CTCCGCCTCA TGAAGCATCT GTTGACCTG AGACAACCGT
GCPS18-129Sam-ba2 TAGTCTCTC CTCC.CCTCA TGAAGCATCT GTTGACCTG AGACAACCGT
GCP18-3129R211-ba2 TAGTCTCTC CTCCGCCTCA TGAAGCATCT GTTGACCTG AGACAACCGT
GCP18-10129R20-ba2 TAGTCTCTC CTCCGCCTCA TGAAGCATCT GTTGACCTG AGACA.CCGT
Consensus tagctctctc ctccgcctca tgaagcatct g.tgcacctg agacaccgt
531                                     580
EMBH44836anti GACGAAACTT TCCGATCACC GCCACCAGAA TTCGACGCCG CGCATCGGAA
GCP18-5CP418L-Sams GACGAAACTT TCCGATCACC GCCACCAGAA TTCGACGCCG CGCATCGGAA
GCP18-2CP418L-Wes GACGAAACTT TCCGATCACC GCCACCAGAA TTCGACGCCG CGCATCGGAA
GCP18-4CP418L-R2000 GACGAAACTT TCCGATCACC GCCACCAGAA TTCGACGCCG CGCATCGGAA
conse129ba1-Drak GACGAAACTT TCCGATCACC GCC.CCAGAA TTCGACGCCG CGCATCGGAA
GCPS18-129Sam-ba2 GACGAAACTT TCCGATCACC GCCACCAGAA TTCGACGCCG CGCATCGGAA
GCP18-3129R211-ba2 GACGAAACTT TCCGATCACC GCCACCAGAA TTCGACGCCG CGCATCGGAA
GCP18-10129R20-ba2 GACGAAACTT TCCGATCCCC GCC.CCAGAA TTCGACGCCG CGCATCGGAA
Consensus gacgaaactt tccgatcacc gccaccagaa ttcgacgccg cgcacccgaa
581                                     630
EMBH44836anti GGATCCGAAT CGGGAAGTGG AGTGAACCCG AGCGATCCCG GGAGTGCAGC
GCP18-5CP418L-Sams GGATCCGAAT CGGGAAGTGG AGTGAACCCG AGCGATCCCG GGAGTGCAGC
GCP18-2CP418L-Wes GGATCCGAAT CGGGAAGTGG AGTGAACCCG AGCGATCCCG GGAGTGCAGC
GCP18-4CP418L-R2000 GGATCCGAAT CGGGAAGTGG . AGTGAACCCG AGCGATCCCG GGAGTGCAGC
conse129ba1-Drak GGATCCGAAT CGGGAAGTGG AGTGAACCCG AGCGATCCCG GGAGTGCAGC
GCPS18-129Sam-ba2 GGATCCGAAT CGGGAAGTGG AGTGAACCCG AGCGATCCCG GGAGTGCAGC
GCP18-3129R211-ba2 GGATCCGAAT CGG.AACTGG AGTGAACCCG AGCGATCCCG GGAGTGCAGC
GCP18-10129R20-ba2 GGATCCGAAT CGGGAAGTGG AGTGAACCCG AGCGATCCCG GGAGTGCAGC
Consensus ggatccgaat cgggaactgg agtgaaccgg agcgatcccg ggagtgcagc

```

Figura 15 (b)


```

631                                     690
EMB44836anti  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
GCP18-129Sam-ba2  GGAGCGATGG GAAAAGAGAG TGGCACGATT TCGACGAAGA GAGGAAGAGG
GCP18-3129R211-ba2 GGAGCGATGG GAAAAGAGAG TGGCACGATT TCGACGAAGA GAGGAAGAGG
GCP18-10129R20-ba2 GGAGCGATGG GAAAAGAGAG TGGCACGATT TCG.CGAAGA GAGGAAGAGG
Consensus      ggagcg.tgg .aaaagagag tggcacgatt tcgacgaaga g.ggaagagg

691                                     740
EMB44836anti  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
GCP18-129Sam-ba2  AGAGGGTGGT GGATAAACTC GCGTATGATC AAGTTCGTCA TCGTCCTGAT
GCP18-3129R211-ba2 AGAGG.TGGT GGATAAACTC GCGTATGATC AAGTTCGTCA TCGTCCTGAA
GCP18-10129R20-ba2 AGAGGGTGGT GGATAAACTC GCGTATGATC AAGTTCGTCA TCGTCCTGAA
Consensus      agaggggtggt ggataaaactc gcgtatgatc aagttcgtca tcgtcctga.

741                                     pSG129antiU 790
EMB44836anti  TGCCGCCATT TTTTTTGTC A GGGCGCTCTG TGGCTTAGAA GTTTCCGATG
GCP18-5CP418L-Sams  TGCCGCCATT TTTTTTGTC A GGGCGCTCTG TGGCTTAGAA GTTTCCGATG
GCP18-2CP418L-Wes  TGCCGCCATT TTTTTTGTC A GGGCGCTCTG TGGCTTAGAA GTTTCCGATG
GCP18-4CP418L-R2000 TGCCGCCATT TTTTTTGTC A GGGCGCTCTG TGGCTTAGAA GTTTCCGTG.
conse129ba1-Drak  TGCCGCCATT TTTTTTGTC A GGGCGCTCTG .GGCTTAGAA GTTTCCGA..
GCP18-129Sam-ba2  TGCCGCCATT CTTGTTTCA. .GGCGCTCTG GGT.....
GCP18-3129R211-ba2 TGCCGCC...
GCP18-10129R20-ba2 TGCC..CAT. CTTGAGCTC. .GG.GCGCGG GCTCACAA..
Consensus      tgccgccat. .tt.....c. .gg.gc.c.g .....

791
EMB44836anti  TCAATGAAC A GTGACACGAC GAAATGC
GCP18-5CP418L-Sams  TCAATGAAC AGAAT...TC CGGG...
GCP18-2CP418L-Wes  CCAATGAACA AGATTATTTC CGATG..
GCP18-4CP418L-R2000 .....
conse129ba1-Drak .....

```

Figura 15 (c)

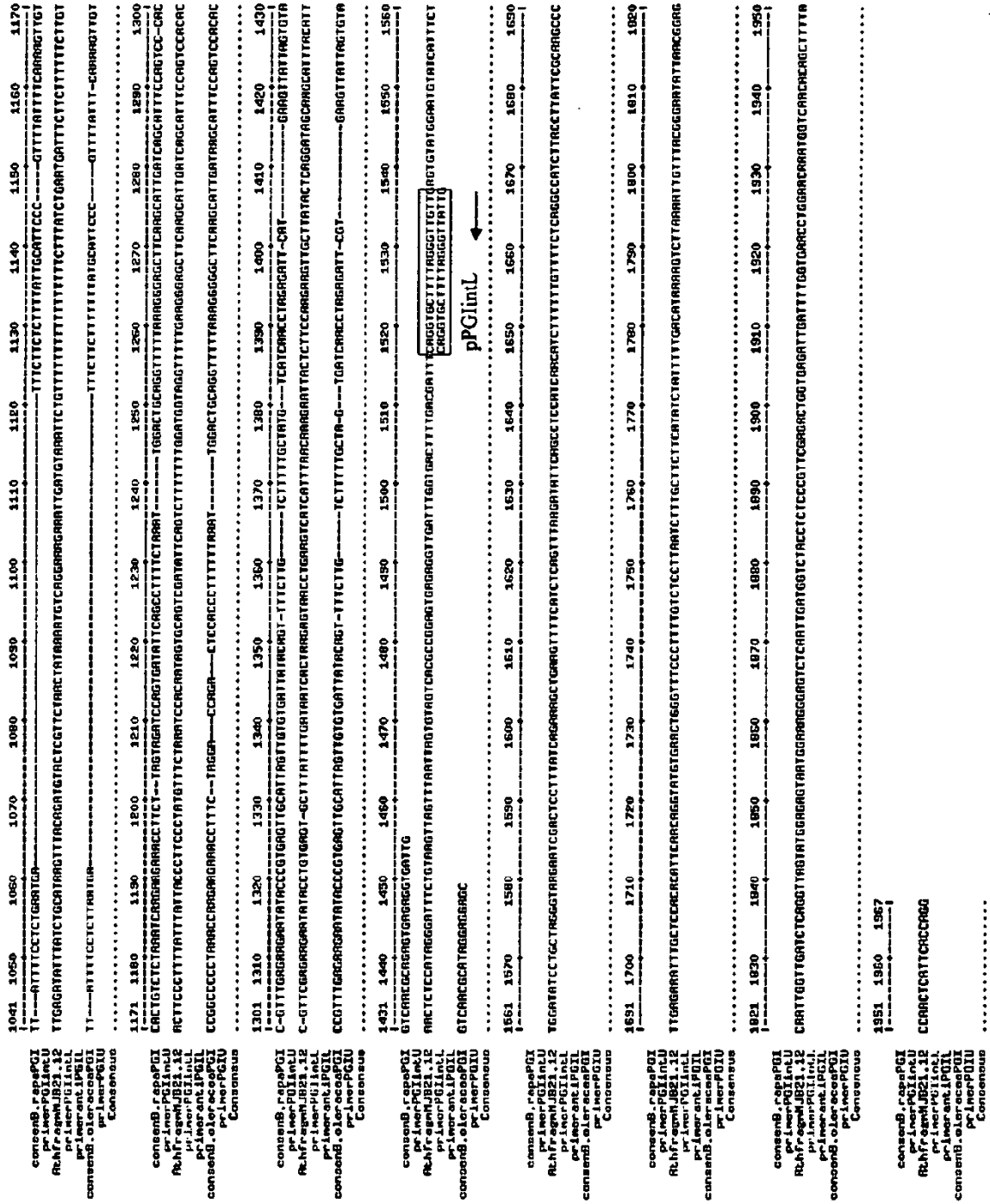


Figura 16 bis

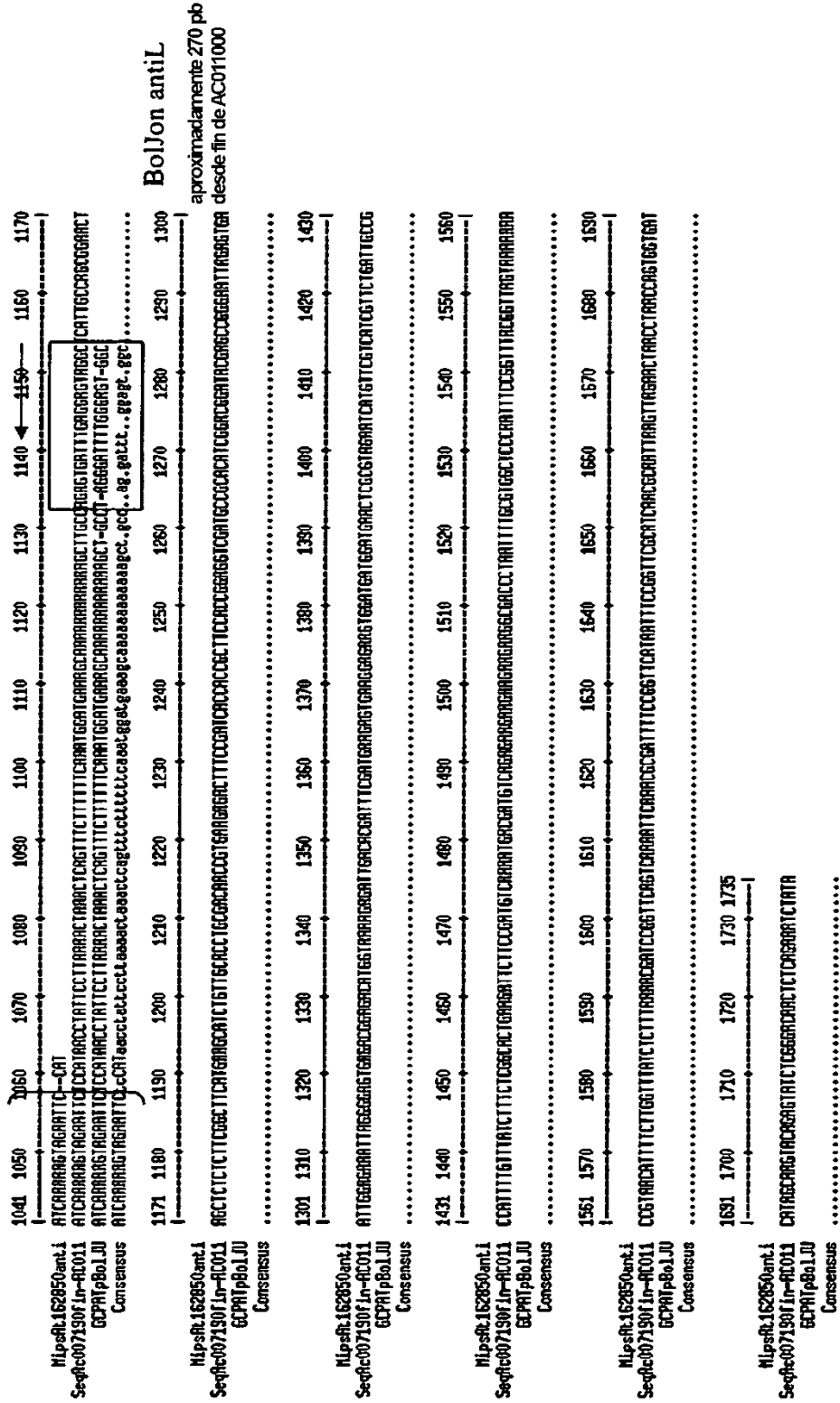


Figura 17 bis