



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1007330-2 B1



(22) Data do Depósito: 05/02/2010

(45) Data de Concessão: 08/10/2019

(54) Título: USO DE UM QUANTITATIVE TRAIT LOCUS 1(QTL1) E DE UM QUANTITATIVE TRAIT LOCUS 2 (QTL2) PARA FORNECER UMA PLANTA RECEPTORA DA ESPÉCIE BRASSICA RESISTENTE A XANTHONAS CAMPESTRIS PY. CAMPESTRIS

(51) Int.Cl.: A01H 1/00; A01H 5/00; C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 06/02/2009 NL 1036531.

(73) Titular(es): BEJO ZADEN B.V..

(72) Inventor(es): JOHANNES THEODORUS WILHELMUS LIGTHART; ROELOF MARINUS VEENSTRA; KLAAS BIERSTEKER; JAN DE GEUS; HENDRIKUS STEPHANUS MARIA HUIJS; ALBERTUS JOHANNES MARIA SCHRIJVER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010051426 de 05/02/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/089374 de 12/08/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/07/2011

(57) Resumo: USO DE UM QUANTITATIVE TRAIT LOCUS 1(QTL1) E DE UM QUANTITATIVE TRAIT LOCUS 2 (QTL2) PARA FORNECER UMA PLANTA RECEPTORA DA ESPÉCIE BRASSICA RESISTENTE A XANTHONAS CAMPESTRIS PY. CAMPESTRIS A presente invenção se refere a planta da espécie Brassica resistente a Xanthomonas campestris pv. campestris (Xcc), e as sementes, frutas e/ou suas partes vegetais, e aos métodos para sua preparação. Especificamente, a presente invenção se refere a uma planta da espécie Brassica oleracea resistente a Xcc e sementes, frutas e/ou suas partes vegetais, e métodos para sua preparação. Além disso, a presente invenção está relacionada aos Quantitative Trait Loci (QTLs) que oferecem a presente resistência a Xcc e a marcadores moleculares, especificamente a marcadores do Polimorfismo de Microsatélites Amplificados Randomicamente (RAMP), para a identificação dos presentes QTLs.

USO DE UM QUANTITATIVE TRAIT LOCUS 1 (QTL1) E DE UM QUANTITATIVE TRAIT LOCUS 2 (QTL2) PARA FORNECER UMA PLANTA RECEPTORA DA ESPÉCIE *BRASSICA* RESISTENTE A *XANTHONAS CAMPESTRIS* PY. *CAMPESTRIS*

Descrição

[0001] A presente invenção se refere a uma planta da espécie *Brassica* resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), e sementes, sementes, frutas e/ou partes vegetais da mesma, e aos métodos para sua preparação. Especificamente, a presente invenção refere-se a uma planta da espécie *Brassica oleracea* resistente a Xcc. A invenção também se refere às sementes, frutas e/ou outras partes vegetais provenientes dessas plantas resistentes. Além disso, a presente invenção refere a 'Quantitative Trait Loci' (QTLs) que proporciona a resistência a Xcc e marcadores moleculares, especificamente marcadores do tipo "Random Amplified Microsatellite Polymorphism" (RAMP), para identificar os presentes QTLs.

[0002] O microrganismo *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é o principal agente causador da doença denominada podridão negra (mais comumente conhecida pelo termo em inglês "black rot") em crucíferas. Mundialmente, o vírus é provavelmente o principal patógeno para as doenças das crucíferas. A "black rot" é comumente encontrada em partes da Europa, América, África, Ásia, Austrália e Oceania. O hospedeiro principal para esta doença bacteriana é *Brassica oleracea*. No entanto, "black rot" também é encontrada em outras crucíferas, ervas daninhas e plantas ornamentais.

[0003] A infecção por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ocorre geralmente através de hidatódios das folhas ou em

alguns casos através dos estômatos ou ferimentos. Após a infecção primária, o vírus se espalha através dos feixes vasculares, causando veias negras e lesões em forma de V nas folhas. Como consequência, uma parte, ou partes da folha ressecam e amarelam.

[0004] A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é uma doença transmissível de sementes capazes de infectar plantas oriundas de sementes em estágios iniciais de desenvolvimento. O microrganismo é capaz de sobreviver em sementes por um período até três anos. A infecção com o vírus também pode ocorrer por meio do armazenamento de partes vegetais, plantas hospedeiras secundárias e sistemas de irrigação.

[0005] O controle da doença através de agentes químicos não é possível. As únicas medidas disponíveis para combater a doença são o uso de material livre da doença, ou seja, de materiais iniciadores a doença e medidas sanitárias tais como a remoção das plantas hospedeiras infectadas. O material iniciador livre de doença pode ser obtido pelo uso de sementes livres do patógeno ou mediante tratar fisicamente as sementes infectadas. O uso e a disponibilidade de espécies vegetais resistentes, que também permanecem imunes da infecção por Xcc durante a estação de crescimento, é o mais preferido a fim de cultivar plantas saudáveis, isto é, plantas livres de Xcc.

[0006] A Brassica é um gênero de plantas da família das Brassicaceae (anteriormente conhecido como Cruciferae). Os membros deste gênero são também conhecidos como couve ou mostarda. O gênero Brassica compreende uma série de importantes culturas agrícolas e hortícolas, incluindo nabo, couve-flor, couve roxa, couve lombarda, repolho branco, couve coração de boi, repolho de caule crespo, brócolis, couve de

Bruxelas, couve chinesa, nabo repolho e nabo Português (tronchuda).

[0007] Uma variedade de partes vegetais e plantas de plantas de Brassica é utilizado para consumo, como as raízes (nabo), caule (couve nabo), folhas (por exemplo, repolho branco e vermelho), botões axilares (brotos), flores (couve-flor, brócolis). Além disso, colza e semente de colza são também utilizados para fornecer óleos vegetais. Algumas espécies com flores brancas ou roxas, ou uma distinta cor ou forma das folhas, são cultivadas para propósitos ornamentais.

[0008] Considerando a importância das plantas da espécie Brassica para produção de alimentos e as perdas econômicas associadas com a infecção por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, é um objetivo, entre outros objetivos, da presente invenção fornecer uma planta da espécie Brassica resistente a Xcc e métodos para a sua preparação.

[0009] A necessidade quanto a uma planta da espécie Brassica resistente a Xcc é ainda indicada pela ausência de meios adequados, econômicos e eficientes para controlar "black rot". Por exemplo, não há biocida disponível contra a bactéria.

[00010] Os objetivos acima da presente invenção, entre outros objetivos, são satisfeitos através de um método para fornecer plantas da espécie Brassica resistentes a Xcc, tal como definido na reivindicação 1.

[00011] Especificamente, os objetivos acima mencionados da presente invenção, entre outros objetivos, são satisfeitos através de um método para fornecer uma planta receptora Brassica resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* que compreende:

selecionar uma primeira planta doadora Brassica

oleracea que compreende um 'Quantitative Trait Locus' 1 (QTL1) no seu genoma;

selecionar uma segunda planta doadora Brassica oleracea que compreende um 'Quantitative Trait Locus' 2 (QTL2) no seu genoma; e

introgredir, ou combinar genomicamente, o 'Quantitative Trait Locus' 1 (QTL1) proveniente da primeira planta doadora e 'Quantitative Trait Locus' 2 (QTL2) proveniente da segunda planta doadora em uma planta da espécie Brassica receptora; onde,

o 'Quantitative Trait Locus' 1 (QTL1) é caracterizado por um ou mais marcadores RAMP escolhido do grupo que consiste de um fragmento de 158-162 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO: 1 e iniciador 6, um fragmento de 283-287 pb com a combinação iniciadora SEQ ID No: 2 e iniciador 6, um fragmento de 370-374 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO: 3 e iniciador 6, e um fragmento de 41 a 45 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO: 4 e iniciador 6;

o 'Quantitative Trait Locus' 2 (QTL2) é caracterizado por um ou mais marcadores RAMP escolhido do grupo que consiste de um fragmento de 88-92 pb com a combinação iniciadora SEQ ID No: 5 e iniciador 6, um fragmento de 125-129 pb com a combinação iniciadora SEQ ID No: 6 e iniciador 6, um fragmento de 334-338 pb com a combinação iniciadora SEQ ID No: 7 e iniciador 6, e um fragmento de 47 a 51 pb com a combinação iniciadora SEQ ID No: 8 e iniciador 6, e

onde a planta da espécie Brassica receptora é, quanto ao seu genoma, não idêntica às primeira e segunda plantas Brassica doadoras.

[00012] De acordo com este primeiro aspecto da presente invenção, a seleção ou identificação, das primeira e segunda plantas doadoras é proporcionado mediante determinar a presença de 'Quantitative Trait Loci' (QTLs), relacionados com a resistência Xcc presente no genoma das respectivas plantas doadoras.

[00013] Tal determinação pode ser preferivelmente fornecida de mediante utilizar técnicas padrões de biologia molecular as quais são usualmente conhecidas na técnica. Um exemplo dessas técnicas compreende isolar DNA genômico de uma potencial planta doadora seguido pela determinação da presença o pertinente 'Quantitative Trait Loci' (QTL) no genoma do isolado através de, por exemplo, PCR, identificações específicas do DNA e borrões Southern.

[00014] Um método particularmente preferido para identificar os presentes locais no genoma das respectivas plantas doadoras é uma técnica de identificação do DNA específico designada na arte como Random Amplified Microsatellite Polymorphism, ou RAMP. Segundo esta técnica, uma reação de PCR, ou reação de amplificação de ácido nucléico, é executada no material genômico isolado da planta doadora, utilizando os presentes iniciadores (SEQ ID n ° s: 1-8) e iniciadores RAPD (Operon RAPD 10-mer kits A-01 - BH-20).

[00015] Em seguida da reação de PCR, os produtos de amplificação obtidos podem ser separados, por exemplo, por eletroforese em gel e seu tamanho em pares-base pode ser determinado, por exemplo, usando uma escada molecular pares-base. Os 'Quantitative Trait Loci' 1 e 2 (QTL1 e QTL2), de acordo com a presente invenção são pelo menos caracterizados pela presença de uma banda com o indicado tamanho do par-base,

além de uma possível pluralidade de outras bandas com outros tamanhos não indicativos quanto à resistência.

[00016] Em seguida da seleção das adequadas plantas doadoras, os locais (QTL1 e QTL2) identificados na planta matriz podem ser introduzidos, ou genomicamente combinados, no genoma da desejada planta receptora. Isso pode ser, por exemplo, fornecido utilizando cruzamentos padrões, ou introgressões, em que a hereditariedade dos presentes QTLs é determinada na progenia, preferivelmente através da determinação da presença dos marcadores como descrito acima. Uma técnica particularmente preferida é o repetido retrocruzamento de preferência em combinação com a análise do marcador.

[00017] De acordo com a presente invenção, a planta da espécie Brassica receptora é, com relação ao seu genoma, não idêntica às primeira e segunda plantas Brassica doadoras. No contexto atual, isso pode ser facilmente determinado por meio da criação de um diferente fenótipo entre as plantas doadora e receptora indicativo quanto ao genoma das plantas doadoras e receptoras ou através de uma análise genômica geral.

[00018] Por conseguinte, o termo "...com respeito a esse genoma, não idêntico ..." de acordo com a presente invenção indica uma ou mais, diferenças fenotípicas não relacionadas com a resistência Xcc entre as plantas doadoras e as plantas receptoras. Em outras palavras, as presentes plantas receptoras são, geralmente, consideradas na prática como uma planta diferente.

[00019] De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, a primeira planta doadora Brassica e a segunda planta doadora Brassica são idênticas com respeito a seu genoma. Isto significa que a seleção de uma primeira e uma

segunda planta doadora compreende selecionar uma planta doadora compreendendo tanto QTL1 como QTL2 em seu genoma. Em outras palavras, esta modalidade preferida compreende a identificação de uma adequada variedade Brassica doadora possuindo ambos QTL1 e QTL2, seguido pela introdução QTL1 e QTL2 na desejada planta Brassica receptora proporcionando resistência Xcc a esta planta receptora.

[00020] De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, o 'Quantitative Trait Locus' 1 (QTL1) é caracterizado por um ou mais marcadores RAMP escolhido do grupo que consiste de um fragmento de 160 pb com a combinação iniciadora 1.1 (SEQ ID NO: 1) e 6 ; um fragmento de 285 pb com a combinação iniciadora 1.2 (SEQ ID NO: 2) e 6; um fragmento de 372 pb com a combinação iniciadora 1,3 (SEQ ID NO: 3) e 6, e um fragmento de 43 pb com a combinação iniciadora 1,4 (SEQ ID NO: 4) e 6.

[00021] De acordo com outra modalidade preferida da presente invenção, o 'Quantitative Trait Locus' 2 (QTL2) é caracterizado por um ou mais marcadores RAMP escolhido do grupo que consiste de um fragmento de 90 pb com a combinação iniciadora 2.1 (SEQ ID NO: 5) e 6 ; um fragmento de 127 pb com a combinação iniciadora 2,2 (SEQ ID No: 6) e 6; um fragmento de 336 pb com a combinação iniciadora 2,3 (SEQ ID NO: 7) e 6, e um fragmento de 49 pb com a combinação iniciadora 2,4 (SEQ ID No: 8) e 6.

[00022] De acordo com uma modalidade particularmente preferida da presente invenção, a seleção de plantas doadoras compreende a determinação ou identificação, por meio de técnicas da biologia molecular, da presença de um ou mais, de preferência de 2 ou mais, mais preferivelmente de 3 ou mais, e

mais preferivelmente de 4, dos marcadores RAMP presentes relativamente aos respectivos QTLs no genoma das respectivas plantas Brassica doadoras.

[00023] De acordo com uma modalidade mais preferida da presente invenção, a seleção, ou identificação, ainda compreende seleção homozíga do 'Quantitative Trait Loci' 1 e 2 (QTLs 1 e 2) na primeira e segunda plantas doadoras Brassica.

[00024] A planta receptora da espécie Brassica de acordo com a presente invenção é preferivelmente uma planta da espécie Brassica oleracea, de preferência escolhida do grupo que consiste de Brassica oleracea convar. var botrytis. botrytis (couve-flor, romanesco), Brassica oleracea convar. var botrytis. cymosa (brócolis), Brassica oleracea convar. var botrytis. asparagoides (brócolis em broto), Brassica oleracea convar. oleracea var. gemnifera (couves de Bruxelas), Brassica oleracea convar. var capitata. alba (repolho branco, couve coração de boi), Brassica oleracea convar. var capitata. rubra (repolho roxo), Brassica oleracea convar. var capitata. sabauda (couve lombarda), Brassica oleracea convar. acephela var. sabellica (repolho crespo Cale), Brassica oleracea convar. acephela var. gongyloides (couve nabo) e Brassica oleracea var. tronchuda syn. costata (repolho Português).

[00025] Considerando as vantagens de uma planta da espécie Brassica resistente a Xcc descrita acima, a presente invenção refere, de acordo com um aspecto adicional, a uma planta Brassica receptora como definido anteriormente, e às sementes, frutas e/ou outras partes vegetais da mesma, incluindo em seu genoma um 'Quantitative Trait Locus' 1 (QTL1) e 'Quantitative Trait Locus' 2 (QTL2), conforme definido acima.

[00026] De acordo com uma modalidade particularmente preferida deste aspecto, a presente invenção refere-se a uma planta da espécie Brassica com o número de depósito NCIMB 41553, bem como as sementes, frutas e/ou outras partes vegetais da mesma.

[00027] De acordo com um aspecto ainda mais, a presente invenção refere-se a utilização de um 'Quantitative Trait Locus' 1 (QTL1) e 'Quantitative Trait Locus' 2 (QTL2), como definido anteriormente, para fornecer uma planta receptora da espécie Brassica resistente a Xanthomonas campestris pv. campestris.

[00028] De acordo ainda com um aspecto, a presente invenção diz respeito à utilização de um ou mais iniciadores selecionados do grupo consistindo de SEQ ID Nos: 1-8 (iniciadores 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 2.3, e 2.4 , respectivamente) para proporcionar uma presente planta da espécie Brassica receptora resistente a Xanthomonas campestris pv. campestris.

[00029] A presente invenção será ainda exemplificada usando o exemplo apresentado a seguir de uma modalidade preferida. Esse exemplo é apenas concebido como ilustrativo, e não a limitar o escopo da presente invenção, conforme descrito nas reivindicações anexas, por qualquer meio.

Breve Descrição dos Desenhos

[00030] A Figura 1 mostra um teste de campo onde a Brassica resistente a Xcc resistente e a Brassica suscetível a Xcc estão presentes.

[00031] A Figura 2 mostra a mesma imagem como na Figura em todas as cores.

Exemplo

[00032] A geração de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) em *Brassica oleracea* é um processo complexo. Diversas variedades de Xcc são descritas e a resistência a Xcc não é geralmente observada em *Brassica oleracea*. As resistências aqui descritas de *Brassica oleracea* a Xcc são de natureza quantitativa, ou seja, a resistência e o nível da mesma, é dependente da herança genética. Isto implica que vários genes estão envolvidos nessa resistência, resultando em que graus de resistência a Xcc podem ser observados.

[00033] A fim de obter A fim de obter uma planta da espécie *Brassica oleracea* qualitativamente resistente, ou seja, a resistência ser observada independente da predisposição genética, uma fonte genética é usada em que a resistência é essencialmente recessiva. Através de um programa de retrocruzamentos, a resistência é introduzida em vários fundos genéticos (linhas genitoras suscetíveis). O nível de resistência das plantas é determinado por um teste de campo. Desde o traço característico específico envolvido é recessivo, cada cruzamento com uma planta suscetível é seguido por uma geração de endogamia, a fim de obter o traço característico específico em uma forma homozigótica. Os descendentes dessa geração devem ser testados quanto ao seu nível de resistência em um teste de campo. Como resultado, isso vai demorar pelo menos dois anos para um relatório anual e pelo menos quatro anos para uma planta bianual, a fim de visualizar um efeito do novo cruzamento.

[00034] Uma vez que a resistência envolvida pode ser expressa como níveis diferentes de resistência, a resistência é expressa em valores quantitativos (numa escala de 0-9, onde 0

representa plena susceptibilidade e 9 representa completa resistência). Foi mostrado que a resistência nos vários fundos genéticos apresentaram uma gradação fenotípica dentro de uma distribuição normal, em lugar de uma simples herança Mendeliana. Essa distribuição pode se deslocar no sentido a uma implicação suscetível de que as gerações de mesma raça, provenientes de cruzamentos entre fontes resistentes e diversas linhagens genitoras suscetíveis, proporcionam diferentes níveis de plantas resistentes.

[00035] Com base nas relações de segregação e nas diferenças nos níveis de resistência, foi demonstrado que o nível de resistência da planta é determinado por vários fatores genéticos ou 'Qualitative Traits Loci'. A fim de identificar marcadores de DNA indicativo, ou seu representante, de uma característica quantitativa, as análises de QTL são usadas frequentemente. As QTLs são regiões cromossômicas independentes as quais, acopladas aos genes subjacentes, em combinação explicam, ou indicam uma traço característico específico.

[00036] A utilização de marcadores de DNA, uma análise QTL da abrangência genômica foi realizada em populações de Brassica oleracea, com diversas origens genéticas. Com plantas dessas diversas populações, testes de campo foram realizados para determinar o nível de resistência das plantas individuais. Os dados da análise do marcador e as pontuações dos testes de campo permitiram a identificação das QTLs responsáveis pela observada resistência a Xcc.

[00037] No total, seis independentemente herdadas QTLs foram identificada a contribuir, em alguma medida, para o nível de resistência observado. A variação dos níveis de resistência

observados no campo, entre as plantas é resultado da presença e/ou ausência de QTLs e as várias combinações desses. Dos seis QTLs é identificados, dois QTLs, denominados aqui como QTL 1 e QTL 2, estavam presentes em cada fundo genético promotor de resistência. Em outras palavras, estes dois QTLs são indicativos de uma resistência qualitativa, enquanto os outros quatro restantes QTLs parecem contribuir para a resistência quantitativa. Um desses QTLs; isto é, QTL 1, pode ser considerado o principal QTL; isto é, o QTL que proporciona a mais forte contribuição para a resistência observada.

[00038] Cada linhagem de geração resistente a *Xanthomonas campestris* py. *campestris* obtidas pelo processo endogâmico possui esse QTL principal. O segundo QTL tem, similar ao QTL principal, uma contribuição para o nível da resistência quantitativa. Todavia, essa contribuição não é tão grande como aquela proveniente do QTL principal, embora ela seja também dependente da predisposição genética.

[00039] Os restantes quatro QTLs são encontradas em diferentes bases genéticas. Esses quatro QTLs podem ter um papel modificador que resulta na variação do nível de resistência.

[00040] Isso é exemplificado na tabela 1 abaixo, onde as plantas *Brassica oleracea* 1 a 6 são exemplos para ilustrar essas observações.

Tabela 1: Visão geral da influência dos diversos QTLs na resistência a Xcc

	QTL1	QTL2	QTL3	QTL4	QTL5	QTL6	Nível de resistência
Planta 1	+	+	+	+	+	+	resistente

Planta 2	+	+	±	±	±	±	resistente
Planta 3	-	-	-	-	-	-	suscetível
Planta 4	-	+	+	+	+	+	suscetível
Planta 5	+	-	+	+	+	+	suscetível
Planta 6	-	-	+	+	+	+	suscetível

Legenda para esta tabela:

+ presente

± pode estar presente, dependendo da base genética exata.

- ausente

[00041] O uso de marcadores de DNA associados aos dois principais QTLs; isto é, QTL' e QTL2, forneceu a oportunidade de selecionar plantas com resistência a Xcc.

[00042] Um teste de doença não irá por si só fornecer plantas possuindo ambos os QTLs numa forma homozigótica. O teste de doença também pode resultar em plantas com um alto nível de resistência com um ou mais QTLs em uma forma homozígua que por si só não irá proporcionar uma resistência estável.

[00043] Realizar um teste de doença, com mais de mil plantas só é possível para um número limitado de cruzamentos. Entretanto, o uso de marcadores de DNA ofereceu a oportunidade para analisar mais populações consistindo de mil plantas, a fim de pré-selecionar as plantas desejadas.

[00044] Além disso, a seleção utilizando marcadores de DNA também ofereceu a oportunidade de realizar repetidos retrocruzamentos onde os dois principais QTLs foram mantidos. Esse método ganhou um ou dois anos por geração de cruzamento o que significa aceleração no programa de melhoramento genético de dez até 20 anos. Este método mais rápido proporciona uma introdução acelerada da nova resistência a Xcc nas variedades híbridas.

[00045] Um outro fator complicador para a produção de variedades híbridas, é a necessária a presença da resistência recessiva em ambos os geradores. Preferivelmente, ambas as linhagens parentais, ou plantas doadoras, são homozíguas com respeito aos dois principais QTLs. Pelo uso de marcadores DNA, a identificação dos geradores homozíguos quanto aos dois principais QTLs e, por conseguinte, adequados para produzir um novo híbrido resistente, pode ser realizada em um período de tempo relativamente curto.

[00046] Sementes de tais híbridos estão depositadas na NCIMB, Aberdeen, Escócia, AB21, 9YA, Reino Unido com o número de depósito NCIMB 41.553.

[00047] Os dois principais QTLs são ambos caracterizados por quatro marcadores DNA que caracterizam a sua presença na fonte. QTL1 é o principal QTL, e QTL2 é o QTL de menor importância.

[00048] Os marcadores DNA foram gerados pela técnica RAMP. A técnica RAMP, onde um iSSR e um iniciador-RAPD são combinados, fornece padrões de banda, compreendendo um ou mais fragmentos DNA em seu interior que especificamente se co-segregam com a resistência. Pelo mapeamento dos fragmentos-RAMP e pontuações fenotípicas de resistência, marcadores-RAMP estreitamente ligados foram identificados os quais identificam o QTL (Tabela 2). A distância genética entre os marcadores DNA contidos no QTL está representada por centimorgans (cM).

[00049] As condições gerais de PCR usadas para a geração dos marcadores DNA são como as seguintes:

Mistura PCR para reação RAMP:

RAMP:				reação			por
~	0,2	ng/μl	de	DNA	genômico	de	plantas

75 mM Tris-HCL (pH 8,8)
 20 mM NH₄SO₄
 0,01% (v/v) Tween20
 2,8 mM MgCl₂
 0,25 mM dNTPs
 0,15 μM iniciador de avanço
 0,20 μM iniciador reverso
 0,04 unidades/μL Red Hot ® DNA Polimerase (ABgene, Epsom)

Programa PCR RAPD35:

		Ciclos
Etapa 1	2 minutos 93 °C	1
Etapa 2	30 segundos 93 °C	
Etapa 3	30 segundos 35 °C	
Etapa 4	aquecimento com 0,3°/s até 72 °C	
Etapa 5	1 min 30 segundos 72 °C	
Repetir etapas 2 a 5		40
Etapa 6	5 minutos 72 °C	1

PAGE/Licor:

[00050] Para análise dos padrões RAMP foi feito uso de analisadores de DNA Gene ReadIR 4200 (Licor Inc.). com base numa concentração ideal de 6,5% de acrilamida, os fragmentos puderam ser separados os quais apresentam uma diferença em tamanho de uma única base.

[00051] A fim de visualizar os fragmentos neste sistema, é necessário utilizar iniciadores marcados (IRDye Labels). Para esse propósito um terço da quantidade do iniciador de avanço

foi substituído por um iniciador marcado com sequência idêntica.

Visão Geral dos Marcadores

[00052] Na pesquisa que levou à presente invenção, os iniciadores como mostrados na tabela 3 foram usados para gerar marcadores DNA como mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Visão Geral dos marcadores RAMP por QTL

QTL	Combinação iniciador RAMP	Tamanho do fragmento (bp)	Posição no QTL (cM)
1	1.1 + 6	160	10,1
1	1.2 + 6	285	18,5
1	1.3 + 6	372	20,9
1	1.4 + 6	43	21,3
2	2.1 + 6	90	28,5
2	2.2 + 6	127	29,4
2	2.3 + 6	336	36,3
2	2.4 + 6	49	37,2

Tabela 3: Visão Geral das SEQ ID NOS:

SEQ ID NO:	Inicia dor	iSSR/RAPD	Sequência
1	1.1	iSSR	TTA GCT CTC TCT CTC TC
2	1.2	iSSR	CCA GCA CAC ACA CAC A
3	1.3	iSSR	AGA TTC TCT CTC TCT C
4	1.4	iSSR	CAA CTC TCT CTC TCT
5	2.1	iSSR	TTG TAG AGA GAG AGA G
6	2.2	iSSR	TCT CTT CTT CTT CTT C
7	2.3	iSSR	CAA CTC TCT CTC TCT
8	2.4	iSSR	GAA ATC TCT CTC TCT C
	6	RAPD	Operon RAPD® 10-mer kits A-01 to BH20 (Operon Biotechnologies, Inc., Huntsville, USA)

[00053] As reações PCR com as diferentes combinações de iniciadores fornecem fragmentos de ácido nucléico com um tamanho de par-base indicado (ver tabela 2) representativo da presença do respectivo QTL. Esses marcadores-DNA são característicos, ou indicativos, quanto aos QTLs em questão. A combinação desses marcadores-DNA, que caracterizam QTL, fornece incontestável evidência da presença de introgressão do QTL proveniente da fonte resistente a Xcc na planta doadora.

Definições

[00054] cM - centimorgan - Unidade de distância genética entre os marcadores, com base no número de cruzamentos por centenas de indivíduos.

[00055] marcador-DNA - Um fragmento de DNA que está ligado a um gene ou outro fragmento de DNA com um local conhecido sobre o genoma, que é usado para monitorar a herança desse gene ou deste local.

[00056] Gel-eletroforese - Método para separar moléculas (DNA, RNA, proteínas), com base no seu tamanho, forma ou carga, em uma matriz (agarose ou poliacríalmida) sob a influência de um campo elétrico.

[00057] Geração endogâmica (auto-polinização) - Fertilização de um indivíduo com seu próprio pólen. Introgressão - Um fragmento de cromossomos de uma linhagem (cultivar) introduzida, por meio de cruzamento, em uma outra linhagem (cultivar).

[00058] IRDye labels - rótulos de infravermelho usados para sistemas de imagens Licor, a detecção dos quais ocorre a 700 nm e 800 nm.

[00059] Monogênico - determinada por um único gene. PCR (Reação de Cadeia Polimerase) - Um método in vitro para a multiplicação da amplificação de um fragmento de DNA específico. Esta reação de síntese faz uso de um mínimo de um iniciador oligonucleotídeo que se hibridiza com um fragmento de DNA, após o que uma polimerase DNA amplifica a região de flanco por meio de sucessivos ciclos de temperatura. Iniciador - Um oligonucleotídeo curto (~ 20-50bp) complementar à sequência de uma molécula DNA de fita única, que serve como ponto de partida de uma polimerase.

[00060] QTLs ('Quantitative Trait Locus') - uma região(s) cromossômica independente que, quando acoplada aos genes, juntos explicam uma característica específica.

[00061] RAMPs (Polimorfismo de Microsatélites Amplificados Randomicamente) - técnica de individualização da identificação do DNA com base em iniciadores RAPD e iSSR com os quais os polimorfismos entre diferentes amostras de DNA são detectados.

[00062] RAPD-iniciador (iniciador do DNA Polimórfico

Amplificado Randomicamente) - um 10-mero com uma sequência "randômica", em que o teor de GC se situa entre 60% e 70% e onde as terminações do iniciador não são auto-complementares.

[00063] iSSR (inter Repetição de Sequência Simples) - um iniciador atribuído na extremidade 5' de uma SSR (Repetição de Sequência Simples); um fragmento DNA consistindo de repetições de 2 ou 3 nucleotídeos.

[00064] BC (Retrocruzamentos) - Cruzamento de um indivíduo com um dos geradores originais.

[00065] XXCC *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

- REIVINDICAÇÕES -

1. USO DE UM 'QUANTITATIVE TRAIT LOCUS' 1 (QTL1) E DE UM 'QUANTITATIVE TRAITLOCUS' 2 (QTL2),

onde o QTL1 tem por característica um ou mais marcadores RAMP escolhido do grupo que consiste de um fragmento de 158-162 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:9; um fragmento de 283-287 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:9; um fragmento de 370-374 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:9; e um fragmento de 41-45 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:9;

o QTL2 tem por característica um ou mais marcadores RAMP escolhido do grupo que consiste de um fragmento de 88-92 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:9; um fragmento de 125-129 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:9; um fragmento de 334-338 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:9; e um fragmento de 41-51 pb com a combinação iniciadora SEQ ID NO:8 e SEQ ID NO:9;

em uma introgressão onde uma primeira planta doadora compreende um QTL1 no seu genoma e uma segunda planta doadora compreende um QTL2 no seu genoma; e

onde a planta da espécie *Brassica* receptora é, com relação ao seu genoma, não idêntica com as primeira e segunda plantas *Brassica oleracea* doadoras,

caracterizado por ser para fornecer uma planta receptora da espécie *Brassica* resistente a *Xanthomonas campestris* *py. campestris* que compreende os QTL1 e QTL2 em seu genoma, tal qual a planta sob o número de depósito NCIMB 41553.

2. USO, de um ou mais iniciadores selecionados do grupo consistindo de SEQ ID Nos. 1 a 4, e um ou mais iniciadores selecionados do grupo consistindo de SEQ ID Nos. 5 a 8, caracterizado por ser para fornecer uma planta receptora da espécie *Brassica* resistente a *Xanthomonas campestris* *py. campestris* que compreende os QTL1 e QTL2 em seu genoma, tal qual a planta sob o número de depósito NCIMB 41553.

FIG 1

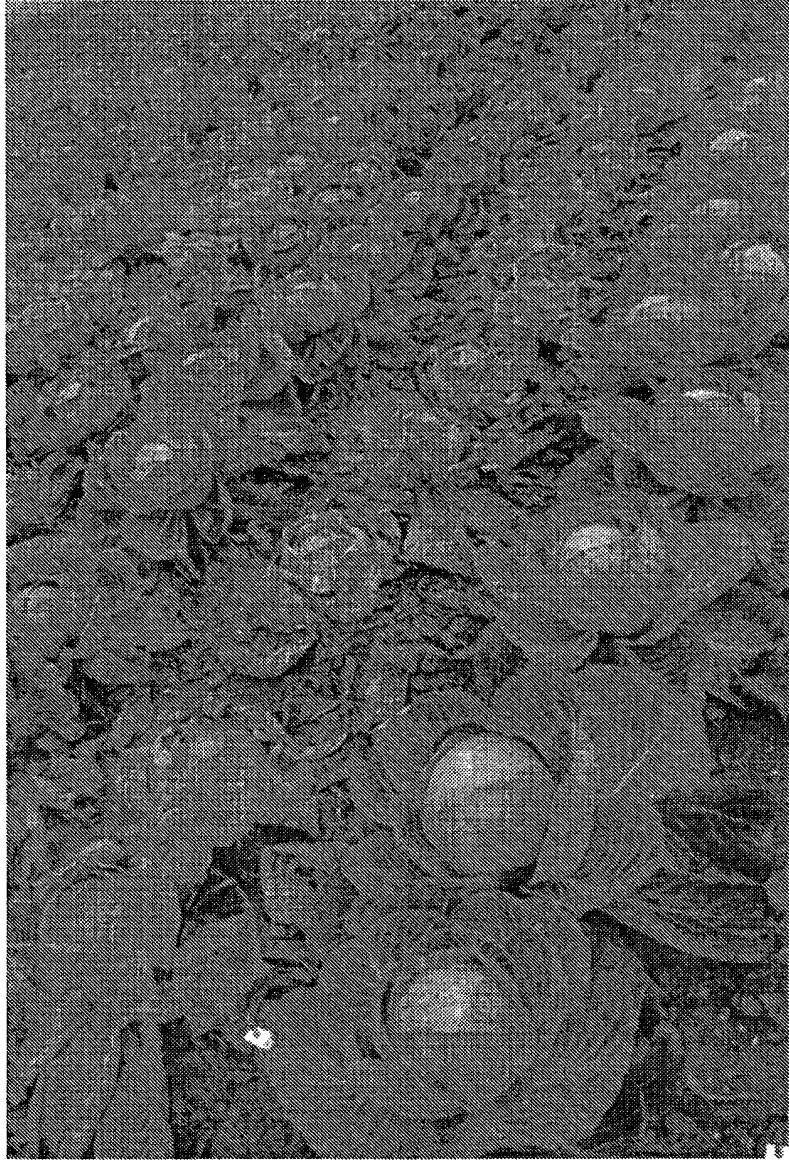


FIG 2

