

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



CSA674092

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

Organización y
Digitalización CSA Ltda

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-123698

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO PLANTAS BRASSICA OLERACEA RESISTENTES AL ALBUGO CANDIDA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A01H 5/00; C12Q 1/68

71. SOLICITANTE BEJO ZADEN B.V.

DOMICILIO 1749 CZ WARMENHUIZEN, HOLANDA, PAISES BAJOS

74. APODERADO GERMAN CASTILLO GRAU

22. BOGOTÁ, D. C.,

PETITORIO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-123698- -00000-0000

Fecha: 2009-11-03 15:29:07
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020-NUEGREACIONE
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 31

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTES

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

2

SOLICITANTE

Nombre: **BEJO ZADEN B.V.**

Dirección: **Trambaan 1**
1749 CZ Warmenhuizen,
Nacionalidad o Domicilio: **Holanda, Países Bajos**

Lugar de Constitución: **Holanda**

Teléfono: Fax:

E- mail:

IDENTIFICACION

☐ C.C.

☐ NIT

☐ C.E.

☐ Otro

Cúal

Número

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **GERMAN CASTILLO GRAU**

Dirección: **Carrera 13 No. 37 - 43 Piso 12**

Teléfono: **285 7460** Fax: **285 9267**

E- mail: **info@castillograu.com**

IDENTIFICACIÓN

☒ C.C.

☐ NIT

☐ C.E.

☐ Otro

Cúal

Número

17.017.671

TP 2.978

de Bogotá

del C.S.J

4

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: **Jan De Geus; Albertus Johannes Maria Schrijver; Johannes Gerardus Maria Hoogland; Adriana Dorien Postma-Haarsma**

Dirección: **Zwanebloem 19; Zigt 13; Johannes Poststraat 18; Groetweg 5**

Nacionalidad o Domicilio: **Oudkarspel; Warmenhuizen; Hoorn; Middenmeer - Holanda**

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/NL2008/050232**

Fecha **Abril 22, 2008**

Solicitud Internacional No. **WO 2008/133503 A1**

Fecha **Noviembre 6, 2008**

6

Título (54)

PLANTAS BRASSICA OLERACEA RESISTENTES AL ALBUGO CANDIDA

7

Clasificación Internacional (51)

A01H 5/00; C12Q 1/68

8

Prioridad

☒ SI ☐ NO

(33) País de Origen

Holanda

(32) Fecha

Mayo 1, 2007

(31) Número de Solicitud

2000622

9

Comprobante de pago No.

8/888

Fecha

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

2

10

Anexos

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. **copia auténtica**

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)

☐

Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la (IPEA)

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☒

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico

☐

Arte final 12x12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☐

Otros

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA:

C.C. 17.017.671 de Bogotá T.P. 2.978 del C.S.J.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 81,888
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-123698- -00000-0000

Fecha: 2009-11-03 15:29:07 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 31

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	46100913	03/11/2009	17,373,600.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PLANTAS BRASSICA OLERACEA RESISTENTES AL ALBUGO CANDIDA

El presente descubrimiento guarda relación con las plantas Brassica oleracea resistentes al Albugo candida, causante de la roya blanca de las crucíferas. El descubrimiento abarca las semillas, frutas y otras partes procedentes de estas plantas resistentes. También guarda relación con un método para conseguir plantas B. oleracea resistentes al A. candida. Está asimismo relacionado con el uso de marcadores de ADN ligados al gen resistente al A. candida para identificar las plantas B. oleracea resistentes.

La roya blanca (A.candida; sinónimos: A.cruciferum, A. cruciferatum, Chahuixtle blanco, white rust, white blister, staghead) es una enfermedad vegetal que causa muchos problemas en las plantas hortícolas como la col y sus variedades, así como en otras plantas emparentadas, como la colza, la mostaza y el rábano. En principio esta enfermedad puede afectar a todas las crucíferas, también a las especies silvestres como el zurrón de pastor (Capsella bursa-pastoris) y la mostaza silvestre (Sinapis arvensis). En contra de lo que sugiere su nombre, no se trata de una roya, sino de un oomiceto estrechamente emparentado con el mildiu (Peronospora parasitica) y el Phytophthora. Los oomicetos no son hongos, aunque también crecen en hebras, sino que están más emparentados con las algas.

El oomiceto produce vesículas con esporas (soros, pústulas) en las hojas, tallos y ovarios (silicuas) de las plantas del género Brassica. A menudo también se dan malformaciones en forma de granos o protuberancias. La infección sistémica de las plantas provoca un crecimiento anormal, malformaciones y a veces esterilidad de las flores o inflorescencias. El entorno ideal para la prosperación del

oomiceto es una temperatura entre 10 y 20 °C, en condiciones húmedas. La humedad en las hojas durante 2,5 horas es suficiente para provocar la infección, con un tiempo de incubación de entre 10 y 14 días. Las condiciones climáticas de humedad o temperatura media son, por lo tanto, ideales para la infección y propagación del oomiceto.

Cuando las esporas de A. candida alcanzan una hoja de col, forman un germen a partir del cual penetran en la planta. Ahí crece el micelio intercelular y se alimenta a través de los haustorios. La esporulación vegetativa se produce en el zoosporangio que se desarrolla bajo la epidermis. Allí se forman las zoosporas asexuales, que en condiciones de suficiente humedad se liberan de los zoosporangios y pueden provocar nuevas infecciones. Las esporas tienen dos colas (flagelos), una para desplazarse y otra para controlar la dirección.

El A. candida puede invernar en el suelo en forma sexual con oosporas de pared celular gruesa, ya sea en plantas afectadas o no, o en forma asexual (micelio) en plantas hospedadoras resistentes a las heladas. Durante los inviernos suaves, el oomiceto no se queda realmente inactivo, sino que permanece en un nivel inferior de actividad. En primavera puede infectar a nuevas plantas. El material de reproducción puede estar ya contaminado en el semillero antes de que haya síntomas visibles. El oomiceto se propaga cuando los esporangios son transportados por movimientos del aire, lluvia fuerte, regadío, utensilios, labradores e insectos, infectando así a otras plantas.

En el A. candida se da la especialización en un hospedador, y se diferencian diversas razas y formae specialis según el tipo de línea afectada y la agresividad de la cepa en la línea.

Brassica es un género botánico de la familia

Brassicaceae (antiguamente llamado Cruciferae). A los miembros de este género se les da el nombre de coles o mostaza. El género Brassica abarca varias importantes plantas de cultivo agrícola, entre las que se encuentran la colza, la coliflor, la lombarda, la berza, el repollo, la col puntiaguda, la col rizada, el brócoli, las coles de bruselas, la col de China, el colirrábano y la col portuguesa (trinchuda). Prácticamente todas las partes de estas plantas se utilizan como alimento, tanto las raíces (colinabo) como los tallos (colirrábano), hojas (repollo), yemas axilares (coles de bruselas), flores (coliflor, brócoli) y las semillas (colza). La colza y la nabina se utilizan también para extraer aceite, tanto para su consumo como de combustible. También algunas variedades con flores blancas o moradas se utilizan con fines ornamentales. La familia de las Brassica se encuentra por todo el mundo y engloba plantas de un año, de dos años y perennes. Incluye también una gran cantidad de especies silvestres.

En la actualidad se conocen pocos métodos para combatir la roya blanca en las Brassica. Además, cada vez más países europeos adoptan una política de reducción de los productos fitosanitarios. La imposibilidad de utilizar plaguicidas puede producir graves problemas para el cultivo de variedades de Brassica. En el caso de plantas como la Brassica rapa (sin. campestris) (nabo, turnip rape), Brassica juncea (mostaza) y Brassica napus (colza) la roya blanca puede producir grandes pérdidas en los cultivos (Bernier, Can. Plant Dis. Surv. 52: 108, 1972; Fan et al., Can. J. Genet. Cytol. 25: 420-424, 1983); Harper and Pittman, Phytopathology 64: 408-410, 1974; Varshney et al., Theoretical and Applied Genetics 109: 153-159, 2004}.

En las plantas hortícolas el aspecto de calidad es fundamental. Las hortalizas como coles de bruselas, repollos

X

y col rizada afectadas de roya blanca no pueden venderse debido al daño estético. Por ello, existe una imperiosa necesidad de plantas Brassica resistentes a esta plaga.

Se ha descrito esta resistencia en diversos tipos de Brassica, como B. rapa, B. napus y B. Juncea (Ebrahimi et al., Proc. Am. phytopathol. Soc. 3: 273, 1976; Delwiche en Williams, Proc. Am. Phytopathol. Soc. 1: 66, 1974; Tiwari et al., Can. J. Of Plant Science 68: 297-300, 1988; Kole et al., Genome 45: 22-27, 2002; Varshney et al., Theoretical and Applied Genetics 109: 153-159, 2004; Tanhuanpaa, Theoretical and Applied Genetics 108: 1039-1046, 2004). Además también se ha encontrado una resistencia parcial en la neas de B. oleracea (Santos & Dias, Genetic Resources and Crop Evolution 51: 713-722, 2004). Sin embargo, aún no se ha registrado una resistencia total a la roya blanca en hortalizas B. oleracea.

El objetivo del presente descubrimiento es facilitar una planta B. oleracea con resistencia al A. candida, causante de la roya blanca.

Para ello, proporciona una planta B. oleracea que contiene un gen resistente al A. candida.

Según las conclusiones del descubrimiento, dicho gen proporciona una resistencia monogénica dominante al A. candida. El gen resistente está presente preferentemente en forma de heterocigoto, y con aun más preferencia en forma de homocigoto.

Este estudio ha comprobado que el gen resistente al A. candida proviene de la planta B. oleracea cuyas semillas se registraron en la American Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, EE.UU.) el 1 de marzo de 2006 con el número PTA 74-12. Se ha descubierto con sorpresa que con el gen resistente se consigue una resistencia dominante al A. candida.

cf

Para lograr una total resistencia al A. candida en plantas B. oleracea este estudio describe la transmisión de una resistencia monogénica y dominante al A. candida, a partir de una primera fuente de B. oleracea a diversos otros
5 tipos de B. oleracea como el repollo, las coles de bruselas, la coliflor y el colirrábano.

Con ayuda de un test de enfermedad para detectar la resistencia a la roya blanca se examinan líneas de B. oleracea y se identifica una fuente de resistencia a la
10 plaga. A continuación se transmite la resistencia de la fuente a líneas de calidad existentes mediante repetidos retrocruzamientos, en algunos casos hasta de 4 a 6 veces, seguidos de varias generaciones de autopolinización. Cada vez se realiza un test de enfermedad para seleccionar las
15 plantas resistentes antes de continuar el programa de retrocruzamiento. En la evaluación de los tests las plantas se distribuyen en las clases de resistentes (sin reacción visible o puntos necróticos), propensas (muchas vejigas con esporas) e intermedias (puntos necróticos y algunas vejigas
20 con esporas). Por las proporciones de distribución durante el programa de retrocruzamiento se dedujo que la resistencia era una cualidad monogénica dominante. Sin embargo, en muchos trasfondos genéticos se encontró una falta de plantas resistentes y además una gran variación de cantidades en la
25 clase intermedia (de unas pocas plantas a la mitad de la muestra). Por lo tanto, la penetración del gen en estos trasfondos genéticos fue muy incompleta, lo que dificultó mucho el programa de mejora.

En otra forma de realización preferente del
30 descubrimiento el gen resistente se liga a uno o más marcadores de ADN específicos. Para poder seguir mejor la resistencia y transmitirla con mayor rapidez el presente estudio ha desarrollado marcadores de ADN estrechamente

ligados a la introgresión con el gen resistente a la roya blanca. Para desarrollarlos se utilizó un BSA (Bulked Segregant Analysis). Se dividieron individuos de un retrocruzamiento bien distribuido (1: 1) en base al test de enfermedad en una clase resistente y una propensa. A continuación se aisló ADN de todas las plantas y las resistentes se unieron a un grupo de resistentes y las propensas a un grupo de propensas. En estos grupos se llevaron a cabo a continuación análisis de marcadores mediante una técnica RAMP, y se identificaron los que se ligaban estrechamente a la resistencia. Mediante un análisis de estos marcadores ligados se seleccionaron con seguridad las plantas que contenían el gen resistente en poblaciones en las que el test de enfermedad no había aportado una imagen unívoca (muchas reacciones intermedias, sin buena proporción en la división). Después, durante el cruce, se diferenciaron directamente las plantas homocigóticas resistentes de las heterocigóticas resistentes, lo que aceleró el programa de mejora.

En una forma de realización preferente del descubrimiento se demuestra la existencia de introgresión con un gen resistente al A. candida con ayuda de al menos dos, preferentemente al menos tres, más preferentemente al menos cuatro, más preferentemente al menos cinco, seis, siete u ocho, e idealmente nueve marcadores de ADN ligados al gen resistente, que encerrasen dicho gen. En la presente solicitud encerrar significa que los marcadores de ADN estén colocados a ambos lados del gen resistente, es decir, tanto "encima" como "debajo" de dicho gen. Al demostrar la presencia de varios marcadores de ADN ligados al gen resistente y que además lo encierran, se asegura que efectivamente hay introgresión con este gen.

Este descubrimiento selecciona preferentemente los

marcadores de ADN de la tabla 1, en donde la presencia de estos en el genoma de la planta se demuestra con ayuda de las secuencias iniciadoras seleccionadas del grupo consistente en las SEC ID N1 hasta la SEC ID N10 (tabla 2).

5 En la investigación que condujo al presente descubrimiento se demuestra que dichos marcadores de ADN son representantes de la introgresión del gen resistente al A. candida. Dichos marcadores son fragmentos de ADN vinculados al gen resistente, que tienen un tamaño
10 determinado (td), como se muestra en la tabla 1, y pueden mostrarse con ayuda de secuencias iniciadoras específicas.

Según el descubrimiento la planta se elige preferentemente del grupo formado por B. oleracea convar. botrytis var. botrytis (coliflor, romanesco), B. oleracea
15 convar. botrytis var. cymosa (brócoli), B. oleracea convar. botrytis var. asparagoides (otra variedad del brócoli), B. oleracea convar. oleracea var. gemnifera (coles de bruselas), B. oleracea convar. capitata var. alba (repollo, col puntiaguda), B. oleracea convar. capitata var. rubra
20 (lombarda), B. oleracea convar. capitata var. sabauda (berza), B. oleracea convar. acephela var. sabellica (col rizada), B. oleracea convar. acephela var. gongyloides (colirrábano) y B. oleracea var. trunchuda sin. costata (col portuguesa).

25 El descubrimiento está relacionado asimismo con las semillas, frutas y otras partes de las plantas antes descritas. Con partes de las plantas nos referimos, entre otras, a las partes comestibles de cada planta, como por ejemplo las yemas axilares (coles de bruselas).

30 También tiene relación con un método para lograr una planta B. oleracea con resistencia al A. candida, que comprende al menos los siguientes pasos:

(a) proporcionar una planta B. oleracea que contenga

un gen resistente al A. candida;

(b) cruzar la planta resistente con una segunda B. oleracea propensa;

(c) el aislamiento de ADN genómico en los
5 descendientes para detectar la presencia de una introgresión
con el gen resistente, con ayuda de uno o más marcadores de
ADN específicos ligados al gen resistente; y

(d) la selección de una planta B. oleracea entre las
descendientes, en la que se haya demostrado la presencia de
10 introgresión con el gen resistente en el paso (c).

Con el método del descubrimiento se pueden conseguir
plantas B. oleracea resistentes de forma rápida y sencilla,
utilizando marcadores de ADN específicos para la
introgresión con el gen resistente conforme al
15 descubrimiento.

Con ayuda del método del presente descubrimiento y el
uso de marcadores de ADN específicos ligados al gen
resistente se puede determinar con facilidad si una planta
contiene dicho gen. La realización del Test de enfermedad es
20 un proceso que lleva mucho tiempo. Es mucho más eficaz la
selección de las plantas resistentes utilizando los
marcadores de ADN específicos ligados a un gen resistente.
De esta forma es posible probar mayores cantidades de
plantas más fácilmente. También resulta más fácil realizar
25 un estudio detallado de la introgresión con el gen
resistente, de forma que se puedan seleccionar las plantas
con la menor introgresión posible. También es posible
diferenciar entre plantas resistentes homocigóticas y
heterocigóticas.

30 En el paso (d) del presente método las plantas
seleccionadas pueden someterse opcionalmente a pasos
complementarios, como uno o varios retrocruzamiento o
autopolinización de una planta obtenida en el paso (d) con

una planta B. oleracea propensa, y a continuación seleccionar de nuevo entre las descendientes una B. oleracea resistente con la ayuda de los marcadores específicos. Las plantas obtenidas en el paso (d) pueden hacerse, por ejemplo, homocigóticas, mediante técnicas conocidas por los especialistas, como el cultivo de granos de polen o de microsporas.

En una realización preferente del método se confirma la presencia de introgresión con el gen resistente en las plantas seleccionadas mediante un test de enfermedad. Al realizar dicho test pueden confirmarse definitivamente la presencia y la acción del gen resistente.

La primera planta B. oleracea contiene preferentemente un gen resistente que aporta una resistencia monogénica dominante contra el A. candida. En una realización preferente del descubrimiento el gen resistente está en forma heterocigótica, con preferencia presente en forma homocigótica.

En una realización preferente la primera planta B. oleracea contiene un gen resistente que proviene de la planta B. oleracea cuyas semillas están registradas en la American Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, EE.UU.) a 1 de marzo de 2006 con el número PTA 74-12.

En una realización preferente posterior del método del descubrimiento la selección de la planta B. oleracea resistente en el paso (d) incluía la selección de una B. oleracea con al menos dos, preferentemente al menos tres, más preferentemente al menos cuatro, más preferentemente al menos cinco, seis, siete u ocho, e idealmente nueve marcadores de ADN ligados al gen resistente, que encerrasen dicho gen. Así se asegura que efectivamente hay introgresión con este gen.

Este descubrimiento selecciona preferentemente los marcadores de ADN de la tabla 1, en donde la presencia de estos en el genoma de la planta se demuestra con ayuda de las secuencias iniciadoras seleccionadas del grupo
5 consistente en las SEC ID N1 hasta la SEC ID N10 (tabla 2).

En una particular realización del descubrimiento la primera planta B. oleracea contiene un gen resistente a la A. candida que proviene de la planta B. oleracea cuyas semillas están registradas en la American Type Culture
10 Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, EE.UU.) a 1 de marzo de 2006 con el número PTA 74-12.

La planta B. oleracea propensa en la que se introduce el gen resistente se elige preferentemente del grupo formado
15 por B. oleracea convar. botrytis var. botrytis (coliflor, romanesco), B. oleracea convar. botrytis var. cymosa (brócoli), B. oleracea convar. botrytis var. asparagoides (otra variedad del brócoli), B. oleracea convar. oleracea var. gemnifera (coles de bruselas), B. oleracea convar.
20 capitata var. alba (repollo, col puntiaguda), B. oleracea convar. capitata var. rubra (lombarda), B. oleracea convar. capitata var. sabauda (berza), B. oleracea convar. acephela var. sabellica (col rizada), B. oleracea convar. acephela var. gongyloides (colirrábano) y B. oleracea var. trunchuda
25 sin. costata (col portuguesa).

El descubrimiento es también relativo a las plantas B. oleracea obtenibles con el método antes descrito, así como las semillas y otras partes de las mismas.

También es relativo al uso de al menos un marcador
30 de ADN ligado a un gen resistente al A. candida para identificar una planta B. oleracea resistente al A. candida; dicho marcador se elegirá de los que aparecen en la tabla 1 y se probará con las secuencias iniciadoras elegidas de

19

entre el grupo formado por las SEC ID N1 hasta SEC ID N10 (tabla 2).

El gen resistente al A. candida proviene preferentemente de la planta B. oleracea cuyas semillas
5 están registradas en la American Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, EE.UU.) a 1 de marzo de 2006 con el número PTA 74-12.

El descubrimiento se explica más a fondo a través de
10 los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 - Poblaciones y test de enfermedad

La fuente resistente a la roya blanca proviene de la antigua línea 9002757 de Bejo Zaden BV, cuyas semillas
15 fueron depositadas en ATCC (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, EE.UU.) el 1 de marzo de 2006 con el número PTA 74-12. Con esta fuente se realizaron cruces con diversas clases de B. oleracea (col rizada, colirrábano, brócoli, repollo, col puntiaguda,
20 lombarda, berza, tronchuda, coliflor y coles de bruselas). Tras el retrocruzamiento con antiguas líneas propensas se consiguieron poblaciones RC1. Para seleccionar entre ellas las plantas resistentes se utilizó un test de enfermedad.

Para la conservación de las cepas de A. candida
25 utilizadas para el test de enfermedad se aíslan zoosporangios procedentes de plantas B. oleracea propensas del campo. Tras germinarlas en agua, las esporas se utilizan para inocular a las plantas propensas. Tras la aparición de las vejigas se cosechan estos zoosporangios y se almacenan
30 en nitrógeno líquido hasta su uso. La prueba de enfermedad final se realiza en el invernadero con plantas germinadas de la población RC1 cuyos cotiledones se hayan desplegado de 24 a 48 horas antes. Las plantas se inoculan con una suspensión

15

de zoosporas fresca (5×10^4 zoosporas por ml) preparada a partir de zoosporangios de plantas propensas germinadas en agua. Se echan algunas gotas de esa suspensión en los cotiledones con una pipeta. Tras el rociado las plantas se meten en un túnel de plástico para lograr las condiciones ideales de infección. Se examinan dos semanas tras la inoculación y se clasifican en resistentes, propensas o intermedias (Williams, Screening crucifers for multiple disease resistance. Workshop september 2-3, 1981, J.F. Friedrich Center, University of Wisconsin, Madison, EE.UU.).

Tras realizar el test de enfermedad en los embriones, se conservan las plantas resistentes para el siguiente paso del programa de retrocruzamiento. Los resultados del test de enfermedad mostraron que la resistencia es en principio una cualidad monogénica dominante. Sin embargo, junto a las plantas con reacciones propensas y resistentes se encontraron frecuentemente plantas con reacciones intermedias. Resultó muy dependiente del trasfondo genético con el que se trabajaba. Del programa se escogieron diversas poblaciones en las que no hubiese apenas o en absoluto reacciones intermediarias, y en las que se diese la proporción prevista en la división (1:1 en caso de retrocruzamiento y 3:1 en la autopolinización).

25 **Ejemplo 2 - Desarrollo de los marcadores**

Para el desarrollo de los marcadores ligados se utilizaron 4 poblaciones de aproximadamente 200 individuos (coliflor, col rizada, tronchuda, repollo). Se aisló ADN de las hojas de todos los individuos ($\sim 0.3 \text{ cm}^2/\text{hoja}$). Se utilizó un método BSA para generar marcadores estrechamente ligados, utilizando la técnica RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphisms) (Matsumoto et al., Mammalian Genome 9: 531-535, 1998; Reiter, PCR-based marker systems, en: R.L.

Philips & I.K. Vasil (eds.), DNA-based markers in plants, Kluwer Academic Publishers, 2001; Weising et al., DNA fingerprinting in plants, principles, methods and application, CRC Press, 2nd. ed. 21-73, 2005).

5 La técnica RAMP, con la que se combinaron un iniciador iSSR y un iniciador RAPD, produjo patrones de banda con fragmentos que cosegregaban específicamente con la resistencia y que permitían diferenciar las plantas con y sin gen resistente. Haciendo un mapa de los fragmentos RAMP
10 se identificaron los marcadores RAMP estrechamente ligados que encerraban el gen resistente.

Ejemplo 3 - Condiciones PCR y análisis de marcadores

15 Las condiciones PCR utilizadas para las reacciones RAMP son las siguientes:

PCR-mix:

20 75 mM Tris-HCl (pH 8.8)
20 mM NH₄SO₄
0.01% (v/v) Tween20
2.8 mM MgCl₂
0.25 mM dNTPs
25 0.15 µM iniciador directo
0.2 µM iniciador inverso
0.04 unidades/µl Red Hot ® ADN Polimerasa (ABgene, Epsom UK.)
~0.2 ng/µl ADN genómico vegetal

30

PCR-programa:

paso 1: 2 min 93°C

- paso 2: 30 seg 93°C
paso 3: 30 seg 35°C
paso 4: calentar con 0,3 °C/seg hasta 72°C
paso 5: 1 min 30 seg 72°C
5 pasos 2-5 repetir x 40

paso 6: 5 min 72°C

Electroforesis en gel de poliacrilamida:

10

Para analizar los patrones RAMP se utiliza "Gene ReadIR 4200 DNA analyzers" (Licor Inc.). En base a una concentración óptima de acrilamida de 6,5% se pueden separar fragmentos que difieren en tamaño de una sola base.

15

Para hacer los fragmentos visibles en este sistema es necesario utilizar iniciadores marcados (marcadores IRDye). Para ello se sustituye una tercera parte de la cantidad de iniciador directo por un iniciador marcado con la misma secuencia.

20

Ejemplo 4 - Relación de marcadores

En las tablas 1 y 2 se muestran las secuencias de los iniciadores para los diferentes marcadores RAMP, el tamaño del fragmento informativo y la distancia estimada a la resistencia en cM en base a la cantidad de cruces entre la población. En el análisis de la cantidad de cruces entre los diversos marcadores se observa que éstos encierran el gen resistente.

30

18

Tabla 1. Relación de los marcadores RAMP

RAMP SEC ID	Tamaño del fragment (td)	Posición en cM en relación con el gen resistente
Combinación		
1+10	325	+6,1
2+10	393	+4,6
3+10	508	+4,2
4+10	830	+1,2
5+10	285	-2,0
6+10	607	-8,8
7+10	875	+0,1
8+10	291	0,0
9+10	138	-0,1

donde + y - muestran que los marcadores se encuentran a
5 ambos lados del gen resistente a la enfermedad

Tabla 2. Relación de números de SEC ID

SEC ID N:	Secuencia
1 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACAAAAAGAGAGAGAGAG
2 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACTACGACACACACACAC
3 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACATACATATATATATATATAT
4 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACCCAGGTGTGTGTGTGTGT
5 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACAGTGGAGAGAGAGAGAGAG
6 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACACTATCTCTCTCTCTC
7 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACATCTTCATCATCATCA
8 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACGTTTGAGAGAGAGA
9 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACCCCACAACAACAACAA
10 Operon RAPD @ 10-mer kits A-01 hasta BH-20	

19

Definiciones

BSA - Bulk Segregant Analysis - Una estrategia de selección con la que se separan en grupos poblaciones muy divididas, individuos con una misma característica (fenotipo) o ADN de esos individuos. Tras examinar dichos grupos con técnicas de ADN se identifican marcadores ligados al fenotipo correspondiente.

CM - centimorgan - Unidad que mide la distancia genética entre marcadores, basándose en la cantidad de recombinaciones por cada cien individuos.

Marcador de ADN - Un fragmento de ADN ligado a un gen o a otra parte del ADN con una ubicación conocida en el genoma y que se utiliza para seguir la transmisión hereditaria de ese gen o ubicación.

Dominante - Alelo que enmascara la expresión fenotópica de otro alelo cuando ambos están presentes.

Electroforesis en gel - Método para separar moléculas (p. ej. ADN, ARN, proteína) en una matriz (agarosa o poliacrilamida) bajo la influencia de un campo eléctrico basándose en su tamaño, forma o carga.

Gen - La unidad básica de información hereditaria, por la que las características hereditarias se transmiten de los progenitores a los descendientes.

Introgresión - Un fragmento de cromosoma de una línea que puede introducirse en otra línea, por ejemplo, mediante cruces.

Marcadores IRDye - Marcadores utilizados por Licor imaging systems, donde la detección tiene lugar a 700 u 800 nm.

Iniciador iSSR (inter Simple Sequence Repeat primer) - Un
5 iniciador desarrollado en el 5' extremo de un SSR (Single Sequence Repeat), una pieza de ADN consistente en una repetición de 2 ó 3 nucleótidos.

Monogénico - Determinado por un solo gen.

10

PCR (polymerase Chain Reaction)- Un método de amplificación *in vitro* para multiplicar un fragmento de ADN específico. Esta reacción de síntesis utiliza al menos un iniciador oligonucleótido que se hibrida con una pieza de ADN, tras lo
15 cual una ADN polimerasa amplifica la región flanqueante mediante un ciclo de temperaturas sucesivas.

Iniciador - Un oligonucleótido corto (~20-50td) complementario de la secuencia de una molécula de ADN
20 monocatenario, que sirve de punto de partida a una polimerasa.

Iniciador RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA primer) - Un 10-mer con una secuencia aleatoria, con un contenido de
25 GC de entre el 60% y el 70% y en el que los extremos del iniciador no son autocomplementarios.

RAMPs (Random Amplified Microsatellite Polymorphisms) - Técnica de análisis de ADN basada en iniciadores RAPD e iSSR
30 con los que se rastrean polimorfismos entre distintas muestras de ADN.

Resistencia - La capacidad de una planta para contrarrestar

1

total o parcialmente los efectos y/o el crecimiento de un patógeno.

RC (Retrocruzamiento) - Cruzamiento de un individuo con uno
5 de los progenitores originales.

CONCLUSIONES

1. Planta Brassica oleracea que contiene un gen
5 resistente al Albugo candida, causante de la roya blanca.

2. Planta conforme a la conclusión 1, en la que el
gen resistente está presente en forma de heterocigoto.

10

3. Planta conforme a la conclusión 1, en la que el
gen resistente está presente en forma de homocigoto.

4. Planta conforme a las conclusiones 1, 2 o 3, en la
15 que el gen resistente proviene de la planta B. oleracea
cuyas semillas están registradas en la American Type Culture
Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University
Boulevard, Manassas, VA 20110, EE.UU.) con el número PTA 74-
12.

20

5. Planta conforme a las conclusiones 1-4, en la que
la existencia de una introgresión con el gen resistente
puede demostrarse con ayuda de al menos un marcador de ADN
específico ligado al gen resistente.

25

6. Planta conforme a la conclusión 5, en la que la
existencia de una introgresión con un gen resistente al
A. candida es demostrable con ayuda de al menos dos
marcadores de ADN ligados al gen resistente, al cual
30 encierran.

7. Planta conforme a alguna de las conclusiones 1-6,
en la que los marcadores se eligen de la tabla 1, en donde

la presencia de estos en el genoma de la planta se demuestra con ayuda de las secuencias iniciadoras seleccionadas del grupo consistente en las SEC ID N1 hasta la SEC ID N10 (tabla 2).

5

8. Planta conforme a alguna de las conclusiones 1-7, elegida del grupo formado por Brassica oleracea convar. botrytis var. botrytis (coliflor, romanesco), Brassica oleracea convar. botrytis var. cymosa (brócoli), Brassica oleracea convar. botrytis var. asparagoides (otra variedad del brócoli), Brassica oleracea convar. oleracea var. gemnifera (coles de bruselas), Brassica oleracea convar. capitata var. alba (repollo, col puntiaguda), Brassica oleracea convar. capitata var. rubra (lombarda), Brassica oleracea convar. capitata var. sabauda (berza), Brassica oleracea convar. acephela var. sabellica (col rizada), Brassica oleracea convar. acephela var. gongyloides (colirrábano) y Brassica oleracea var. trunchuda sin. costata (col portuguesa).

20

9. Las semillas, frutas y otras partes de una planta conforme a alguna de las conclusiones 1-8.

10. Método para la obtención de una planta Brassica oleracea resistente al Albugo candida, que incluya

- (a) proporcionar una planta B. oleracea que contenga un gen resistente al A. candida;
- (b) cruzar la planta resistente con una segunda B. oleracea propensa;
- (c) el aislamiento de ADN genómico en los descendientes para detectar la presencia de una introgresión con el gen resistente, con ayuda de uno o más marcadores de ADN específicos ligados

30

24

al gen resistente; y

- (d) la selección de una planta B. oleracea entre las descendientes, en la que se haya demostrado la presencia de introgresión con el gen resistente en el paso (c).

5

11. Método conforme a la conclusión 10, en el que el gen resistente está presente en forma de heterocigoto.

10

12. Método conforme a la conclusión 10, en el que el gen resistente está presente en forma de homocigoto.

13. Método conforme a las conclusiones 10, 11 o 12, en el que la existencia de introgresión con el gen resistente en las plantas seleccionadas se confirma mediante un test de enfermedad.

15

14. Método conforme a alguna de las conclusiones 10-13, en el que el gen resistente proviene de una planta B. Oleracea, cuyas semillas se depositaron el 1 de marzo de 2006 en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número PTA 74-12.

20

15. Método conforme a alguna de las conclusiones 10-14, en el que la selección de la planta B. oleracea en el paso (d) incluye la selección de una B. oleracea que contenga al menos dos marcadores de ADN ligados al gen resistente y que lo encierren.

25

16. Método conforme a alguna de las conclusiones 10-15, en el que el marcador se escoge de la tabla 1, y se muestra con alguna de las secuencias iniciadoras del grupo formado por las SEC ID N1 hasta la SEC ID N10 (tabla 2).

30

25

17. Método conforme a alguna de las conclusiones 10-16, donde la planta B. oleracea propensa se elige del grupo formado por B. oleracea convar. botrytis var. botrytis (coliflor, romanesco), B. oleracea convar. botrytis var. cymosa (brócoli), B. oleracea convar. botrytis var. asparagoides (otra variedad del brócoli), B. oleracea convar. oleracea var. gemnifera (coles de bruselas), B. oleracea convar. capitata var. alba (repollo, col puntiaguda), B. oleracea convar. capitata var. rubra (lombarda), B. oleracea convar. capitata var. sabauda (berza), B. oleracea convar. acephela var. sabellica (col rizada), B. oleracea convar. acephela var. gongyloides (colirrábano) y B. oleracea var. trunchuda sin. costata (col portuguesa).

18. Planta B. oleracea resistente al A. candida obtenible con un método según alguna de las conclusiones 10-17.

20

19. Uso de al menos un marcador de ADN ligado a un gen resistente al A. candida para identificar una planta B. oleracea resistente al A. candida; dicho marcador se elegirá de los que aparecen en la tabla 1 y se probará con las secuencias iniciadoras elegidas de entre el grupo formado por las SEC ID N1 hasta SEC ID N10 (tabla 2).

25

76

RESUMEN

- 5 El presente descubrimiento guarda relación con las plantas Brassica oleracea que contienen un gen resistente al Albugo candida, causante de la roya blanca de las crucíferas. El descubrimiento está asimismo relacionado con un método para la obtención de una planta Brassica oleracea
- 10 con resistencia al A. candida, que incluye
- (a) proporcionar una planta B. oleracea que contenga un gen resistente al A. candida;
 - (b) cruzar la planta resistente con una segunda B. oleracea propensa;
 - 15 (c) el aislamiento de ADN genómico en los descendientes para detectar la presencia de una introgresión con el gen resistente, con ayuda de uno o más marcadores de ADN específicos ligados al gen resistente; y
 - 20 (d) la selección de una planta B. oleracea entre las descendientes, en la que se haya demostrado la presencia de introgresión con el gen resistente en el paso (c).

Castillo Grau & Associates

Law Offices
P.O. Box 251473
Bogotá, Colombia

27

FOR PATENTS AND TRADEMARKS IN

COLOMBIA

PODER GENERAL

(1) BEJO ZADEN B.V.

domiciliado en (2) Trambaan 1, 1749 CZ
Warmenhuizen, Holanda, Países Bajos

nombra al Dr. Germán Castillo Grau y/o Adriana
Castillo Gibsone y/o Luis Felipe Castillo Gibsone

.....
con oficinas en la Carrera 13 No. 37-43, Piso 12
en Bogotá, D.C., Colombia como sus
representantes con poder especial amplio y
suficiente, para recabar de las oficinas y
autoridades Colombianas, administrativas,
judiciales o de policía, en primera o segunda
instancia, la Obtención de Patentes de
Invención, Registro de Marcas, de Diseños
Industriales, de Nombres y Enseñas
Comerciales, lo mismo que traspasos,
extensiones, renovaciones, cambios de nombre
y domicilio, registro de licencias de explotación y
registro de licencias de uso referentes a tales
actuaciones, a cuyo efecto les faculta para dar
ante dichas autoridades todos los pasos
necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes,
formular descripciones, enmiendas, protestas,
declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar
la aplicación de medidas cautelares, aceptar en
nuestro nombre y representación la Cesión de
derechos de invención y de patente de invención
que se nos haga por cualquier persona, abonar
todos los impuestos cuotas y pagos
determinados por la ley, recibir todos los
documentos y valores dando el descargo
respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos,
desistir, y tomar en fin todas las medidas que
creyeren conducentes al resguardo de nuestros
intereses y en caso de presentarse oposiciones
para que intervengan como demandantes o
como demandados, con todas las demás
facultades legales necesarias. Este poder
comprende además las facultades de recibir,
desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar
sustituciones, recibir notificaciones y nombrar
apoderados judiciales o extra-judiciales

Dado y firmado en (4)

Firma/Signature

Corporate Seal to be Affixed

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(1) BEJO ZADEN B.V.

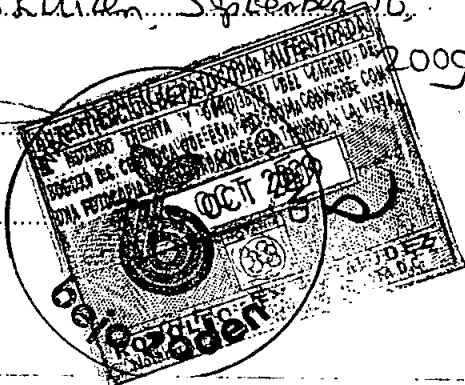
domiciled in (2) Trambaan 1, 1749 CZ
Warmenhuizen, The Netherlands

hereby appoint Dr. Germán Castillo Grau and/or
Adriana Castillo-Gibsone and/or Luis Felipe
Castillo-Gibsone

.....
with offices at Carrera 13 No. 37-43, 12th Floor in
Bogotá, Colombia as our representatives with
special ample and sufficient power to obtain from
the offices and Colombian authorities,
administrative, judicial and police, in first or in
second instance, Patents of Invention,
registration of Trade or Service Marks, Industrial
Designs, of Commercial Names and Ensigns, as
well as assignments, extensions, renewals,
changes of names and addresses, registration of
licences of exploitation and licences of use
referring to said actions who are empowered to
take before said authorities all of the necessary
steps for the purposes indicated, to file
applications, to formulate descriptions,
corrections, protests, declarations, appeals and
claims, apply for precautionary measures, to
accept on our behalf and representation the
assignment of rights on invention and titles of
invention that may be given to us by any person,
to pay all taxes, quotas and payments
prescribed by law, to receive all the documents
and proceeds giving the respective
acquiescence or receipt, to fulfill any other
requisites to desist and take in fact any other
measures that may be deemed conducive to the
safeguard of our interests, and in case
oppositions are presented to intervene as
plaintiff or defendant, with all necessary legal
faculties. This power includes the faculties to
receive, desist, compromise, transact, substitute
it in all or in part, to revoke substitutions, to
receive notifications and to appoint judicial or
extra-judicial attorneys.

Given and signed in (4)

Warmenhuizen, September 6, 2009





Reino de
los Países Bajos

V° B°

Certificación en virtud del art. 69 del
Código de Comercio

Yo, Drs. **Pierre Henri Marie KEESOM**,
legalizador público (corredor en marcas)
prestación de juramento ante la Corte de
Apelación de Amsterdam (publicada en el
Diario del Estado del 18 de diciembre de
1973, No. 245) y certificado (Hobéon/SKO
No. R 18582), legalizo la firma del Señor Don
Cornelis Petrus Adrianus MOSCH
(pasaporte No. NH7866070) apoderado de la
compañía **Bejo Zaden B.V.** (une compañía
constituida y existente en virtud de las leyes
de los Países Bajos con domicilio en
Trambaan 1, 1749 CZ Warmenhuizen, Países
Bajos, Cámara de Comercio No. 37048509) y
competente de firmar según un abstracto de la
Cámara de Comercio de 21 de septiembre de
2.009.

Doy fe.

El legalizador no asume responsabilidad alguna para el
contenido del documento presente.

La Haya, el 23 de septiembre de 2.009



Keesom

www.keesom.nl - Keesom & Hendriks N.V. - The Hague-NL

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

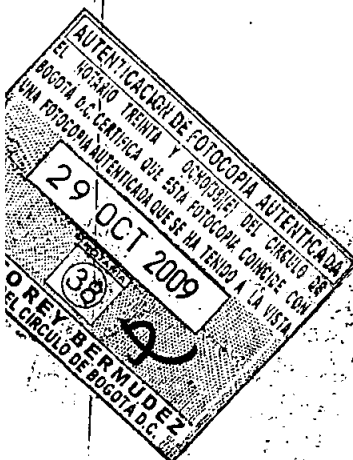
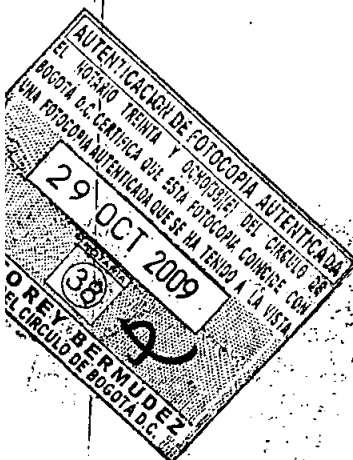
1. Pais: Los Países Bajos
El presente documento público
2. ha sido firmado por **drs. P.H.M. Keesom**
3. quien actúa en calidad de legalizador público de marcas
4. y está revestido del sello/timbre de el susodicho legalizador

Certificado

5. en La Haya
6. el día **25-9-2009**
7. por el Secretario Judicial del Tribunal de Distrito
8. bajo el número: **2009-5799/3**
9. Sello/timbre:
10. Firma:

C.D. van de Ree

[Handwritten signature]



CESION

ASSIGNMENT

El (los) abajo firmado(s)

The undersigned

Jan DE GEUS
Albertus Johannes Maria SCHRIJVER
Johannes Gerardus Maria HOOGLAND
Adriana Dorien POSTMA-HAARSMA

Por el presente documento manifiesta(n) que, por la suma de

Hereby declare(s) that, for the sum of

Cede(n) y traspara(n), sin reserva ni limitación a

Assign(s) and transfer(s) without any reservation of limitation to

BEJO ZADEN B.V.
Trambaan 1
1749 CZ Warmenhuizen
The Netherlands

Todos los derechos inherentes al invento relativo a

All rights inherent to the invention related to

PCT/NL2008/050232

Del cual es(son) único(s) inventor(es) quedando facultada dicha sociedad para solicitar en su nombre la patente correspondiente en cualquier país que estime conveniente.

Of which they(he) are (is) the sole inventor(s); the assignee hereof, having the right to apply in its name, in any country that they may deem convenient, for the corresponding patent.

Dado y firmado en _____

Given and signed at _____

el _____ de _____
20 _____

on _____
20 _____

Jan DE GEUS

Albertus Johannes Maria SCHRIJVER

Johannes Gerardus Maria HOOGLAND

Adriana Dorien POSTMA-HAARSMA

Reino de
los Países Bajos

V° B°

*Certificación en virtud del art. 69 del
Código de Comercio*

Yo, Drs. **Pierre Henri Marie KEESOM**,
legalizador público (corredor en marcas)
prestación de juramento ante la Corte de
Apelación de Amsterdam (publicada en el
Diario del Estado del 18 de diciembre de
1973, No. 245) y certificado (Hobéon/SKO
No. R 18582), legalizo la firma del Señor Don
Jan DE GEUS (pasaporte No. NXH6063F1),
del Señor Don **Albertus Johannes Maria
SCHRIJVER** (pasaporte No. NF1569067),
del Señor Don **Johannes Gerardus Maria
HOOGLAND** (pasaporte No. NG6329454) y
de la Señora Doña **Adriana Maria
POSTMA-HAARSMA** (licencia de conducir
No. 3172394441, inventores y del Señor Don
Cornelis Petrus Adrianus MOSCH
(pasaporte No. NH7866070) apoderado de la
compañía **Bejo Zaden B.V.** (une compañía
constituida y existente en virtud de las leyes
de los Países Bajos con domicilio en
Trambaan 1, 1749 CZ Warmerhuizen, Países
Bajos, Cámara de Comercio No. 37048509) y
competente de firmar según un abstracto de la
Cámara de Comercio de 21 de septiembre de
2.009.

Doy fe.

El legalizador no asume responsabilidad alguna para el
contenido del documento presente.

La Haya, el 23 de septiembre de 2.009



Keesom

www.keesom.nl - Keesom & Hendriks N.V. - The Hague-NL



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pais: Los Países Bajos
El presente documento público
2. ha sido firmado por **drs. P.H.M. Keesom**
3. quien actúa en calidad de legalizador publico de marcas
4. y está revestido del sello/timbre de el susodicho legalizador

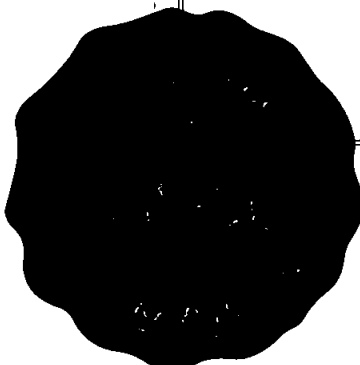
Certificado

5. en La Haya
6. el día **25-9-2009**
7. por el Secretario Judicial del Tribunal de Distrito
8. bajo el número: **2009-5799**
9. Sello/timbre:

10. Firma:

C.D. van de Ree

[Signature]



**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Bejo Zaden BV
Attn: Cor Glas
P.O. Box 50
NL-1749ZH, Warmerhuizen
The Netherlands

Deposited on Behalf of: Bejo Zaden BV

Identification Reference by Depositor:
Cabbage, Brassica Oleracea: 9002757
Cabbage, Brassica Oleracea: 9009899

Patent Deposit Designation
PTA-7412
PTA-7413

The seeds were accompanied by: ☒ a scientific description ___ a proposed taxonomic description indicated above. The seeds were received March 1, 2006 by this International Depository Authority and have been accepted.

AT YOUR REQUEST: ☒ We will inform you of requests for the seeds for 30 years.

The seeds will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the seeds and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said seeds.

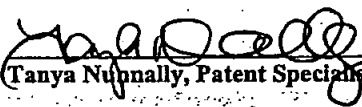
If the seeds should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with viable seeds of the same.

The seeds will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the seeds cited above was tested March 27, 2006. On that date, the seeds were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:


Tanya Nunnally, Patent Specialist, ATCC Patent Depository
cc: Arnold & Seidsma
(Ref: Docket or Case No.: 2M/2BQ7818)

Date: May 16, 2006

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.193 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
0-2	International Application No.	PCT/NL2008/050232
0-3	Applicant's or agent's file reference	2M/2FV56

1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	4
1-2	line	32
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	ATCC American Type Culture Collection
1-3-2	Address of depositary institution	10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America
1-3-3	Date of deposit	01 March 2006 (01.03.2006)
1-3-4	Accession Number	ATCC PTA 7412
1-5	Designated States for Which Indications are Made	all designations

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the International Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

37



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA LA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

.(21)	No. SOLICITUD		.(51)	INT.CL:	A01H 5/00; C12Q 1/68
.(22)	FECHA DE PRESENTACION		.(71)	SOLICITANTE:	
				BEJO ZADEN B.V.	
.(30)	PRIORIDAD		.(72)	INVENTOR(ES):	
.(31)	No. DE SOLICITUD	2000622		Jan De Geus; Albertus Johannes Maria Schrijver; Johannes Gerardus Maria Hoogland; Adriana Dorien Postma-Haarsma	
	FECHA DE PRESENTACION	Mayo 1, 2007			
.(33)	PAIS	Holanda	.(74)	APODERADO:	
				GERMAN CASTILLO GRAU	

.(54) TITULO: PLANTAS BRASSICA OLERACEA RESISTENTES AL ALBUGO CANDIDA

.(57) RESUMEN

El presente descubrimiento guarda relación con las plantas Brassica oleracea que contienen un gen resistente al Albugo candida, causante de la roya blanca de las crucíferas. El descubrimiento está asimismo relacionado con un método para la obtención de una planta Brassica oleracea con resistencia al A. candida, que incluye

- (a) proporcionar una planta B. oleracea que contenga un gen resistente al A. candida;
- (b) cruzar la planta resistente con una segunda B. oleracea propensa;
- (c) el aislamiento de ADN genómico en los descendientes para detectar la presencia de una introgresión con el gen resistente, con ayuda de uno o más marcadores de ADN específicos ligados al gen resistente; y
- (d) la selección de una planta B. oleracea entre las descendientes, en la que se haya demostrado la presencia de introgresión con el gen resistente en el paso (c).

**REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

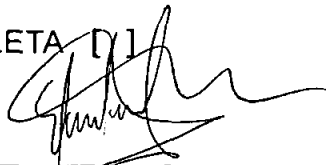
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-123698-00000-0000

Fecha: 2009-11-03 15:29:07 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTE(YI) Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 31

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10

Conmutador: 3 82 0840

Fax: 3505220

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá D.C. - Colombia



Bogotá,
2020

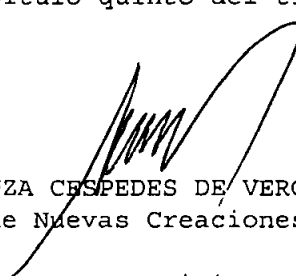
Doctor(a)
CASTILLO GRAU GERMAN
Apoderado(a) y/o Representante de
BEJO ZADEN B.V.

REFERENCIA	Radicación No.	9 123698
	Solicitud internacional	PCT/NL2008/050232
	Fecha inicio fase nacional	01/12/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	14365

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 17 Dic. 2009
adpall