

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 373**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2008 PCT/NL2008/050232**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2008 WO08133503**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2008 E 08741653 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024 EP 2139311**

54 Título: **Plantas de brassica oleracea con resistencia a albugo candida**

30 Prioridad:

01.05.2007 NL 2000622

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

26.03.2025

73 Titular/es:

BEJO ZADEN B.V. (100.00%)

Trambaan 1

1749 CZ Warmenhuizen, NL

72 Inventor/es:

GEUS, DE, JAN;

SCHRIJVER, ALBERTUS JOHANNES MARIA;

HOOGLAND, JOHANNES GERARDUS MARIA y

POSTMA-HAARSMA, ADRIANA DORIEN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 009 373 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

Plantas de brassica oleracea con resistencia a albugo candida

5 La presente invención se refiere a plantas de Brassica oleracea que son resistentes a Albugo candida, la causa de la roya blanca. La invención también se refiere a las semillas, frutos y/u otras partes de planta de estas plantas resistentes.

10 La roya blanca (A. candida); sinónimos: A. cruciferum, A. cruciferatum, roya blanca, *staghead*) es una enfermedad de las plantas que causa muchos problemas en los cultivos hortícolas de col, pero también en especies relacionadas, como la colza, la mostaza y el rábano. En principio, la enfermedad puede presentarse en todas las crucíferas y también en especies silvestres como la bolsa de pastor (Capsella bursa-pastoris) y la mostaza silvestre (mostaza de campo, Sinapis arvensis). Al contrario de lo que sugiere su nombre, no se trata de un hongo de la roya sino de un oomiceto estrechamente relacionado con el mildiú vellosa (Peronospora parasitica) y Phytophthora. Los oomicetos no son hongos
15 y, aunque también crecen en filamentos, están más relacionados con las algas.

El oomiceto produce ampollas con esporas (soros, pústulas) en las hojas, los tallos y los ovarios (silicuas) de las plantas de Brassica. Con frecuencia, también suelen presentarse distorsiones en forma de manchas. La infección sistémica de las plantas produce un crecimiento anormal, deformaciones y, en ocasiones, esterilidad de las flores o inflorescencias. El oomiceto prospera mejor a temperaturas entre 10 y 20 °C y en condiciones húmedas. Un período de humedad de las hojas de 2,5 horas es suficiente para provocar una infección, en la que se da un período de incubación de 10 a 14 días. Por lo tanto, las condiciones climáticas húmedas con temperaturas moderadas son ideales para la infección y la propagación del oomiceto.

25 Cuando las esporas de A. candida se depositan en una hoja de col, forman un tubo germinativo con el que penetran en la hoja. Aquí, el micelio crece de forma intercelular y absorbe los nutrientes a través de los haustorios. La formación de esporas vegetativas tiene lugar en el zoosporangio que se desarrolla debajo de la epidermis. Aquí, se crean las zoosporas asexuales que, cuando existe suficiente humedad, se liberan desde los zoosporangios y pueden provocar así nuevas infecciones. Las esporas tienen dos colas en forma de látigo (flagelos), una para moverse hacia delante y
30 otra para la dirección natatoria.

A. candida puede pasar el invierno en el suelo en forma sexual con oosporas de paredes espesas, que pueden estar o no estar en los retazos de plantas infectadas, o en forma asexual (micelio) en plantas hospedadoras resistentes al invierno. Durante los inviernos suaves, el oomiceto no se desactiva realmente, sino que permanece activo a un nivel inferior. Las plantas nuevas pueden infectarse en primavera. El material vegetal también puede estar ya infectado en el lecho de la planta sin que los síntomas se hagan visibles. La propagación del oomiceto se produce a través de esporangios arrastrados por los movimientos del aire, las fuertes lluvias, el riego, las máquinas, los trabajadores agrícolas y los insectos, infectando así otras plantas.

40 Se conoce la especialización de huésped en A. candida y las diferentes especies fisiológicas y formae specialis se distinguen en función de la especie o la línea infectada y la agresividad del aislado en la línea.

Brassica es un género de plantas de la familia de las Brassicaceae (anteriormente denominadas Cruciferae). Los miembros de este género reciben el nombre de col o mostaza. El género Brassica comprende varios cultivos agrícolas y hortícolas importantes, incluidos la colza, la coliflor, la col lombarda, la col de Milán, la col blanca, la col corazón de buey, el kale rizado, el brócoli, las coles de Bruselas, la col china, la col nabo y la col portuguesa (trinchuda). Casi todas las partes de las plantas se utilizan como alimento, como las raíces (nabo), los tallos (col nabo), las hojas (col blanca), las yemas axilares (brotes), las flores (coliflor, brócoli) y las semillas (colza). La colza y las semillas de colza también se utilizan como aceite, tanto para consumo como para combustible. Algunas especies con flores blancas o moradas, o con un color o forma distintos de las hojas, se cultivan con fines ornamentales. La familia Brassica se encuentra en todo el mundo y se compone de plantas anuales, bienales y perennes. La familia también comprende un gran número de especies silvestres.

55 Por el momento se conocen pocos agentes que puedan usarse para controlar la roya blanca en Brassica. Además, un número cada vez mayor de países de Europa tiene una política destinada a reducir el uso de agentes protectores de cultivos. Si ya no se permite el uso de agentes de control en absoluto, esto puede ocasionar problemas importantes en el cultivo de las especies de Brassica. En cultivos como, por ejemplo, Brassica rapa (sin. campestris) (nabina), Brassica juncea (mostaza) y Brassica napus (colza), la roya blanca puede provocar enormes pérdidas de rendimiento (Bernier, *Can. Plant Dis. Surv.* 52: 108, 1972; Fan y col., *Can. J. Genet. Cytol.* 25: 420-424, 1983; Harper y Pittman, *Phytopathology* 64: 408-410, 1974; Varshney y col., *Theoretical and Applied Genetics* 109: 153-159, 2004). En los cultivos hortícolas, el aspecto de calidad es particularmente importante. Verduras tales como los brotes, el repollo y la col rizada infectadas por roya blanca ya no se pueden vender debido a los daños estéticos. Por lo tanto, existe una gran necesidad de cultivos hortícolas de Brassica que sean resistentes a la roya blanca.

65 La resistencia a la roya blanca se describe en diversas especies de Brassica, tales como B. rapa, B. napus y B. juncea (Ebrahimi y col., *Proc. Am. Phytopathol. Soc.* 3: 273, 1976; Delwiche y Williams, *Proc. Am. Phytopathol. Soc.*

1: 66, 1974; Tiwari y col., Can. J. Of Plant Science 68: 297-300, 1988; Kole y col., Genome 45: 22-27, 2002; Varshney y col., Theoretical and Applied Genetics 109: 153-159, 2004; Tanhuanpää, Theoretical and Applied Genetics 108: 1039-1046, 2004). Además, se ha demostrado una resistencia parcial en líneas de B. oleracea (Santos y Dias, Genetic Resources and Crop Evolution 51: 713-722, 2004). Sin embargo, aún no se ha descrito una resistencia total a la roya blanca en los cultivos hortícolas de B. oleracea.

El objeto de la presente invención es proporcionar una planta de B. oleracea con resistencia a A. candida, la causa de la roya blanca.

La invención proporciona con este fin una planta de B. oleracea que comprende un gen de resistencia a A. candida.

El gen de resistencia tal como se define en las reivindicaciones adjuntas proporciona una resistencia monogénica y dominante a A. candida. El gen de resistencia está presente preferiblemente en forma heterocigótica y, más preferiblemente, el gen de resistencia está presente en forma homocigótica.

El gen de resistencia a A. Candida descrito en la presente descripción proviene de la planta de B. oleracea, cuyas semillas se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Estados Unidos de América) el 1 de marzo de 2006 con el número PTA 74-12. Sorprendentemente, se ha descubierto que con el gen de resistencia se proporciona una resistencia dominante a A. candida.

Para obtener una resistencia total a A. candida en B. oleracea, se describe la transmisión de una resistencia monogénica dominante a A. candida de una primera fuente de B. oleracea a otros tipos diferentes de B. oleracea, tal como col blanca, coles de Bruselas, coliflor y col nabo.

Mediante una prueba de enfermedad para determinar la resistencia a roya blanca, se examinaron líneas de B. oleracea y se identificó una fuente de resistencia a roya blanca. Luego, la resistencia se transmitió desde la fuente a líneas de calidad existentes mediante retrocruzamientos repetidos, en algunos casos, hasta cuatro o seis veces, seguido de múltiples generaciones de autopolinización. En este caso, se realizó una prueba de enfermedad cada vez para seleccionar las plantas resistentes para la continuación del programa de retrocruzamiento. Al evaluar estas pruebas de enfermedad, las plantas se agruparon en las clases resistentes (sin reacción visible ni manchas necróticas), susceptibles (muchas ampollas esporulantes) e intermedias (manchas necróticas y varias ampollas esporulantes). A partir de las relaciones de segregación encontradas durante el programa de retrocruzamiento, se descubrió que la resistencia era un rasgo dominante monogénico. Sin embargo, se descubrió una falta de plantas resistentes en muchos antecedentes genéticos y, además, una gran variación en los números en la clase intermedia (desde varias plantas hasta la mitad de la población). Por lo tanto, la penetración de este gen fue muy incompleta en estos antecedentes genéticos y, como resultado, el programa de reproducción se vio muy perjudicado.

El gen de resistencia está vinculado a uno o más marcadores de ADN específicos. Para poder controlar mejor la resistencia y transmitirla más rápidamente, se han desarrollado marcadores de ADN RAMP que están estrechamente vinculados a la introgresión que contiene el gen de resistencia a la enfermedad contra la roya blanca. Estos marcadores se han desarrollado mediante un BSA (análisis de segregantes agrupados). Con tal fin, individuos de una población de BC con segregación correcta (1:1) se dividieron sobre la base de la prueba de la enfermedad en una clase resistente y una clase susceptible. A continuación, se aisló el ADN de todas las plantas y las plantas resistentes se agruparon para formar un grupo resistente y las plantas susceptibles para formar un grupo susceptible. A continuación, se realizaron análisis de marcadores en estos grupos mediante la técnica RAMP y se identificaron los marcadores que estaban estrechamente vinculados a la resistencia. Mediante un análisis con los marcadores estrechamente vinculados, se seleccionaron con certeza las plantas que contenían el gen de resistencia en poblaciones en las que la prueba de enfermedad no produce una imagen inequívoca (muchas reacciones intermedias, no una buena relación de segregación). Además, las plantas resistentes homocigóticas se diferencian directamente de las plantas resistentes heterocigóticas durante la endogamia. Esto da como resultado un programa de reproducción acelerado.

La presencia de la introgresión con el gen de resistencia a A. candida puede demostrarse usando al menos dos, preferiblemente, al menos tres, más preferiblemente, al menos cuatro, más preferiblemente, al menos cinco, seis, siete u ocho, con máxima preferencia, nueve marcadores de ADN con una vinculación al gen de resistencia, en donde los marcadores de ADN incluyen el gen de resistencia. En la presente solicitud, se entiende que encerrar significa que los marcadores de ADN se ubican en el genoma a ambos lados del gen de resistencia, es decir, «corriente arriba» y «corriente abajo» del gen de resistencia. La demostración de la presencia de una pluralidad de marcadores de ADN, con una vinculación al gen de resistencia y que además incluyen el gen de resistencia, asegura que la introgresión con el gen de resistencia esté realmente presente.

Los marcadores de ADN se seleccionan de la tabla 1, en donde la presencia de los marcadores de ADN en el genoma de la planta se demuestra usando las secuencias de cebadores que se seleccionan del grupo que consiste en la Id. de sec. n.º 1 a la Id. de sec. n.º 9 inclusive (tabla 2) en combinación con un cebador Operon RAPD® de los kits A-01 a BH-20 10-mer.

En la investigación que condujo a la presente invención, se ha demostrado que los marcadores de ADN relevantes son característicos de la introgresión de la resistencia a A. candida. Los marcadores de ADN son fragmentos de ADN con una vinculación al gen de resistencia relevante, tienen un tamaño determinado (pb), como se indica en la tabla 1 y pueden demostrarse usando combinaciones de cebadores específicas.

La planta según la invención se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en B. oleracea convar. botrytis var. botrytis (coliflor, romanesco), B. oleracea convar. botrytis var. cymosa (brócoli), B. oleracea convar. botrytis var. asparagoides (brotes de brócoli), B. oleracea convar. oleracea var. gemnifera (coles de Bruselas), B. oleracea convar. capitata var. alba (col blanca, col corazón de buey), B. oleracea convar. capitata var. rubra (col lombarda), B. oleracea convar. capitata var. sabauda (col de Milán), B. oleracea convar. acephela var. sabellica (kale rizado), B. oleracea convar. acephela var. gongylodes (col nabo) y B. oleracea var. trunchuda sin. costata (col portuguesa).

La invención también se refiere a las semillas, frutos y/u otras partes de planta de las plantas descritas anteriormente. Se entiende en el presente documento por partes de planta, entre otras, las partes comestibles de la planta, tales como, por ejemplo, las yemas axilares (brotes).

Se describe un método para obtener una planta de B. oleracea con resistencia a A. candida, cuyo método comprende al menos las siguientes etapas de:

- (a) proporcionar una primera planta de B. oleracea, cuya planta comprende un gen de resistencia a A. candida;
- (b) cruzar la planta resistente con una segunda planta de B. oleracea susceptible;
- (c) aislar el ADN genómico de la progenie para detectar la presencia de una introgresión con el gen de resistencia utilizando uno o más marcadores de ADN específicos vinculados al gen de resistencia; y
- (d) seleccionar de la progenie una planta de B. oleracea, en la que se haya demostrado la presencia de la introgresión con el gen de resistencia en la etapa (c).

Con el método descrito, pueden proporcionarse plantas de B. oleracea resistentes de manera rápida y sencilla, haciendo uso de marcadores de ADN que son específicos de la introgresión con el gen de resistencia.

Usando el método descrito y mediante el uso de los marcadores de ADN específicos con vinculación a un gen de resistencia, es posible determinar de manera sencilla si una planta contiene el gen de resistencia. Realizar la prueba de enfermedad es un procedimiento que lleva mucho tiempo. La selección de plantas resistentes mediante la utilización de los marcadores de ADN específicos vinculados a un gen de resistencia es mucho más eficiente. De este modo, es posible analizar más fácilmente un mayor número de plantas. La introgresión con el gen de resistencia también se puede asignar más fácilmente, por lo que se pueden seleccionar plantas con la menor introgresión posible. Además, se puede realizar una distinción entre plantas resistentes homocigóticas y heterocigóticas.

Las plantas seleccionadas en la etapa (d) del método descrito pueden pasar opcionalmente por etapas adicionales, tales como retrocruzamiento o autopolinización de la planta obtenida en la etapa (d) una o más veces con una planta de B. oleracea susceptible y una selección posterior, una vez más, de la progenie de una planta de B. oleracea resistente usando los marcadores de ADN específicos. Las plantas obtenidas en la etapa (d) también pueden hacerse homocigotas, por ejemplo, mediante técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como el cultivo de anteras y/o microsporas.

En el método, la presencia de la introgresión con el gen de resistencia en las plantas seleccionadas se confirma mediante una prueba de enfermedad. La presencia y el efecto del gen de resistencia pueden confirmarse definitivamente realizando una prueba de enfermedad.

La primera planta de B. oleracea comprende un gen de resistencia, que proporciona una resistencia monogénica y dominante a A. candida. En una realización preferida de la invención, el gen de resistencia está presente en forma heterocigótica, preferiblemente, en forma homocigótica.

La primera planta de B. oleracea comprende un gen de resistencia derivado de la planta de B. oleracea, cuyas semillas se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Estados Unidos de América) el 1 de marzo de 2006 con el número PTA 74-12.

En el método descrito, la selección de la planta de B. oleracea resistente en la etapa (d) puede comprender seleccionar una planta de B. oleracea que comprende al menos dos, preferiblemente, al menos tres, más preferiblemente, al menos cuatro, más preferiblemente, al menos cinco, seis, siete u ocho y, con máxima preferencia, nueve marcadores de ADN vinculados al gen de resistencia, en donde los marcadores de ADN incluyen el gen de resistencia. De esta manera, es posible determinar con certeza que la planta realmente posee la introgresión con el gen de resistencia.

Los marcadores de ADN RAMP se seleccionan de la tabla 1, en donde la presencia de los marcadores de ADN en el genoma de la planta se demuestra usando las secuencias de cebadores, que se seleccionan del grupo que consiste en la Id. de sec. n.º 1 a la Id. de sec. n.º 10 inclusive (tabla 2).

5 En una realización particular según la invención, la primera planta de B. oleracea comprende un gen de resistencia a A. candida derivado de la planta de B. oleracea, cuyas semillas se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Estados Unidos de América) el 1 de marzo de 2006 con el número PTA 74-12).

10 La planta de B. oleracea susceptible, en la que se inserta el gen de resistencia se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en B. oleracea convar. botrytis var. botrytis (coliflor, romanesco), B. oleracea convar. botrytis var. cymosa (brócoli), B. oleracea convar. botrytis var. asparagoides (brotes de brócoli), B. oleracea convar. oleracea var. gemnifera (coles de Bruselas), B. oleracea convar. capitata var. alba (col blanca, col corazón de buey), B. oleracea convar. capitata var. rubra (col lombarda), B. oleracea convar. capitata var. sabauda (col de Milán), B. oleracea convar. acephela var. sabellica (kale rizado), B. oleracea convar. acephela var. gongylodes (col nabo) y B. oleracea var. trunchuda sin. costata (col portuguesa).

20 Se describe el uso de al menos un marcador de ADN vinculado a un gen de resistencia a A. candida para identificar una planta de B. oleracea que es resistente a A. candida, en donde el marcador de ADN se selecciona entre los marcadores de ADN de la tabla 1 y en donde el marcador de ADN se demuestra con las secuencias de cebadores, que se seleccionan del grupo que consiste en la Id. de sec. n.º 1 a la Id. de sec. n.º 9 inclusive (tabla 2) en combinación con un cebador Operon RAPD® de los kits A-01 a BH-20 10-mer.

25 El gen de resistencia se origina a partir de la planta de B. oleracea, cuyas semillas se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Estados Unidos de América) el 1 de marzo de 2006 con el número PTA 74-12.

La invención se explica con mayor detalle sobre la base de los siguientes ejemplos.

30 Ejemplo 1 - Ensayo de poblaciones y enfermedad

35 La fuente de resistencia a roya blanca se origina de la línea precursora 9002757 de Bejo Zaden BV, cuyas semillas se depositaron en (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Estados Unidos de América) el 1 de marzo de 2006 con el número PTA 74-12. Utilizando esta fuente, se realizaron cruces con diferentes especies de B. oleracea (kale rizado, col nabo, brócoli, brotes de brócoli, col blanca, col corazón de buey, col lombarda, col de Milán, tronchuda, coles de Bruselas y coliflor). Se obtuvieron poblaciones BC1 tras el retrocruzamiento con las líneas precursoras susceptibles. Se utilizó una prueba de enfermedad para seleccionar las plantas resistentes de estas poblaciones.

40 Con el fin de preservar los aislados de A. candida que se utilizan para la prueba de enfermedad, se aislaron zoosporangios de plantas de B. oleracea susceptibles del campo. Tras la germinación en agua, las esporas se usaron para inocular plantas susceptibles. Tras el desarrollo de las ampollas, estos zoosporangios se recolectaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. La eventual prueba de enfermedad se llevó a cabo en el invernadero con plántulas de la población BC1, cuyas hojas cotiledonares se habían desarrollado de 24 a 48 horas antes. Las plantas fueron inoculadas con una suspensión de zoosporas frescas (5×10^4 zoosporas por ml), que se preparó lavando los zoosporangios de las plantas susceptibles y permitiendo su germinación en agua. Se pipetearon varias gotas de suspensión de zoosporas sobre las hojas cotiledonares. Tras el pipeteo, las plantas siguieron desarrollándose bajo un túnel de plástico para garantizar las condiciones óptimas para la infección. Dos semanas después de la inoculación, se evaluaron las plantas, agrupándolas en las clases resistente, susceptible o intermedia (Williams, Screening crucifers for multiple disease resistance. Workshop, 2-3 Septiembre 1981, J.F. Friedrich Center, University of Wisconsin, Madison, EE.UU.).

55 Después de realizar la prueba de enfermedad en las plántulas, las plantas resistentes se retuvieron para la siguiente etapa del programa de retrocruzamiento. Los resultados de la prueba de enfermedad mostraron que la resistencia era, en principio, un rasgo dominante monogénico. Sin embargo, también se descubrieron con frecuencia plantas con reacciones intermedias, además de plantas con reacciones susceptibles y resistentes. Se descubrió que esto dependía en gran medida de los antecedentes genéticos en los que se estaba realizando el trabajo. Se seleccionaron diferentes poblaciones del programa, en donde no existió, o casi no existió, reacción intermedia y en donde también se descubrió la relación de segregación esperada (1:1 para un BC y 3:1 para una autopolinización).

60 Ejemplo 2 - Desarrollo de marcadores

65 Para el desarrollo de marcadores de ADN vinculados, se utilizaron cuatro poblaciones de aproximadamente 200 individuos (coliflor, kale rizado, tronchuda, col blanca). El ADN de todos los individuos se aisló de muestras foliares obtenidas con un punzón (~0,3 cm²/muestra foliar obtenida con un punzón). Se utilizó un método BSA para generar marcadores de ADN estrechamente vinculados, con la ayuda de la técnica RAMP (polimorfismos de microsátélites

amplificados al azar) (Matsumoto y col., Mammalian Genome 9: 531-535, 1998; Reiter, PCR-based marker systems, en: R.L. Phillips & I.K. Vasil (eds.), DNA-based markers in plants, Kluwer Academic Publishers, 2001; Weising y col., DNA fingerprinting in plants, principles, methods and application, CRC Press, 2ª ed., 21-73, 2005).

5 La técnica RAMP, en donde se combinaron un cebador iSSR y un cebador RAPD, produjo patrones de bandas con fragmentos en las mismas, que se segregaron simultáneamente y específicamente con la resistencia, y en donde se pudo hacer una distinción entre plantas con y sin el gen de resistencia. Al asignar los fragmentos de RAMP, se identificaron marcadores RAMP estrechamente vinculados, que incluyen el gen de resistencia.

10 Ejemplo 3 - Condiciones de PCR y análisis de marcadores

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

Mezcla por PCR

15 Tris-HCl 75 mM (pH 8,8)

NH₄SO₄ 20 mM

20 0,01 % (v/v) Tween20

MgCl₂ 2,8 mM

desoxinucleósido trifosfato (dNTP) 0,25 mM

25 cebador directo 0,15 μM

cebador inverso 0,2 μM

30 0,04 unidades/μl de ADN-polimerasa Red Hot® (ABgene, Epsom, Reino Unido)

~ 0,2 ng/μl de ADN genómico de la planta

Programa de PCR:

35 etapa 1: 2 min. 93 °C

etapa 2: 30 s. 93 °C

etapa 3: 30 s. 35 °C

etapa 4: calentamiento a 0,3 °/s hasta 72 °C

etapa 5: 1 min. 30 s. 72 °C

etapas 2-5: repetir 40 veces

etapa 6: 5 min. 72 °C

Electroforesis en gel de poliacril

40 Para el análisis de los patrones de RAMP se utilizaron «analizadores de ADN Gene ReadIR 4200» (Licor Inc.). Sobre la base de una concentración óptima del 6,5 % de acrilamida, se pueden separar los fragmentos que tengan una diferencia de tamaño con respecto a una sola base.

Para hacer visibles los fragmentos en este sistema, es necesario utilizar cebadores etiquetados (etiquetas IRDye). Para ello, se sustituyó un tercio de la cantidad del cebador directo por un cebador etiquetado con la misma secuencia.

45 Ejemplo 4 - Visión general de marcadores

En las tablas 1 y 2, para los diferentes marcadores RAMP figuran las secuencias de los cebadores, el tamaño del fragmento informativo y la distancia estimada desde la resistencia en cM en función del número de entrecruzamientos en la población. El análisis del número de entrecruzamientos entre los diferentes marcadores muestra que los

50 marcadores incluyen el gen de resistencia.

Tabla 1: Visión general de los marcadores RAMP

ES 3 009 373 T3

Id. de Sec. RAMP	Tamaño del fragmento (pb)	Posición en cM con respecto al gen de resistencia
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

en donde + y - indican que los marcadores se encuentran en cada lado del gen de resistencia a la enfermedad

Tabla 2. Visión general de Id. de sec. núms.

Id. de sec. n.º	Secuencia
1 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACAAAAAGAGAGAGAGAG
2 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACTACGACACACACACAC
3 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACATACATATATATATATAT
4 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACCCAGGTGTGTGTGTGT
5 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACAGTGGAGAGAGAGAGAG
6 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACACTATCTCTCTCTCTC
7 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACATCTTCATCATCATCA
8 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACGTTTGAGAGAGAGA
9 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACCCCACAACAACAACAA
10 Kits A-01 a BH-20 10-mer de Operon RAPD®	

5

Definiciones

10 **BSA (Análisis de segregantes agrupados)**: estrategia de selección, en la que, en grandes poblaciones segregantes, individuos con el mismo rasgo (fenotipo) o ADN de estos individuos se agrupan en «grupos». Tras el cribado de estos grupos con técnicas de ADN, se identifican los marcadores que se ligan al fenotipo relevante.

cM (centimorgan): unidad de la distancia genética entre marcadores, basada en el número de entrecruzamientos por cada cien individuos.

15 **Marcador de ADN**: un fragmento de ADN que se vincula a un gen u otra parte de ADN con una ubicación conocida en el genoma, que se utiliza para monitorizar la heredabilidad de este gen o esta ubicación.

Dominante: alelo que enmascara la expresión fenotípica de otro alelo, cuando ambos están presentes.

20 **Electroforesis en gel**: método para separar moléculas (ADN, ARN, proteínas, entre otros), en función de su tamaño, forma o carga, en una matriz (agarosa o poliacrilamida) bajo la influencia de un campo eléctrico.

Gen: la unidad básica de la herencia, mediante la cual los rasgos hereditarios se transmiten de los precursores a la progenie.

25 **Introgresión**: un fragmento cromosómico de una línea que, por ejemplo, puede insertarse en otra línea mediante cruce.

ES 3 009 373 T3

Etiquetas IRDye: etiquetas que se utilizan para sistemas de imágenes Licor, cuya detección se realiza a 700 nm u 800 nm.

5 **Cebador ISSR** (intersecuencia simple repetitiva): un cebador diseñado en el extremo 5' de una SSR (secuencia única repetitiva), una parte de ADN que consiste en una repetición de 2 o 3 nucleótidos.

Monogénico: determinado por un solo gen.

10 **PCR** (reacción en cadena de la polimerasa): un método de amplificación *in vitro* para multiplicar un fragmento de ADN específico. Esta reacción de síntesis utiliza al menos un cebador oligonucleotídico, que se hibrida con una parte de ADN, tras lo cual una ADN-polimerasa amplifica la región flanqueadora mediante ciclos de temperatura sucesivos.

15 **Cebador:** un oligonucleótido corto (~20-50 pb) complementario a la secuencia de una molécula de ADN monocatenario, que sirve como punto de partida de una polimerasa.

Cebador RAPD (cebador de ADN polimórfico amplificado al azar): un 10-mer con una secuencia «aleatoria», en donde el contenido de GC se encuentra entre el 60 % y el 70 %, y en donde los extremos del cebador no son autocomplementarios.

20 **RAMP** (Polimorfismos de microsatélites amplificados al azar): técnica de huella genética basada en cebadores RAPD e iSSR, con la que se detectan polimorfismos entre diferentes muestras de ADN.

Resistencia: la capacidad de una planta para evitar total o parcialmente los efectos y/o el crecimiento de un patógeno.

25 **BC** (retrocruzamiento): cruce de un individuo con uno de los precursores originales.

REIVINDICACIONES

1. Planta de *Brassica oleracea*, que comprende un gen de resistencia dominante a *Albugo candida*, la causa de la roya blanca, en donde el gen de resistencia proviene de la planta de *Brassica oleracea*, cuyas semillas se depositaron el 1 de marzo de 2006 en la American Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Estados Unidos de América) con el número PTA 74-12, en donde dicha planta de *Brassica oleracea* se obtiene mediante un método que comprende:

- (a) proporcionar una planta de *Brassica oleracea* PTA 74-12;
 (b) cruzar una planta de *Brassica oleracea* PTA 74-12 con una planta de *Brassica oleracea* susceptible;
 (c) aislar el ADN genómico de la progenie para detectar la presencia de una introgresión con el gen de resistencia utilizando uno o más cebadores de intersecuencia simple repetitiva (iSSR) específicos seleccionados del grupo que consiste en las Id. de sec. n.º 1 a 9 para detectar polimorfismos de microsatélites amplificados al azar (RAMP) vinculados al gen de resistencia; y
 (d) seleccionar de la progenie una planta de *Brassica oleracea*, en la que se haya demostrado la presencia de la introgresión con el gen de resistencia en la etapa (c);

en donde los polimorfismos de microsatélites amplificados al azar (RAMP) se seleccionan del grupo que consiste en:

- un fragmento de 325 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 1 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 393 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 2 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 508 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 3 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 830 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 4 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 285 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 5 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 607 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 6 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 875 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 7 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 291 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 8 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 138 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 9 y la Id. de sec. n.º 10;

en donde la Id. de sec. n.º 10 es un cebador Operon RAPD® de los kits A-01 a BH-20 10-mer.

2. Planta de *Brassica oleracea* según la reivindicación 1, en donde la planta de *Brassica oleracea* se selecciona del grupo que consiste en coliflor, romanesco, brócoli, brotes de brócoli, coles de Bruselas, col blanca, col corazón de buey, col lombarda, col de Milán, kale rizado, col nabo y col portuguesa.

3. Semillas, frutos y/u otras partes de planta de una planta de *Brassica oleracea* según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende el gen de resistencia dominante a *Albugo candida* de la planta de *Brassica oleracea* depositada el 1 de marzo de 2006 en la American Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Estados Unidos de América) con el número PTA 74-12, el gen de resistencia dominante a *Albugo candida* es detectable usando polimorfismos de microsatélites amplificados al azar (RAMP) seleccionados del grupo que consiste en:

- un fragmento de 325 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 1 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 393 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 2 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 508 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 3 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 830 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 4 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 285 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 5 y la Id. de sec. n.º 10;
 -un fragmento de 607 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 6 y la Id. de sec. n.º 10;

ES 3 009 373 T3

- 5
- un fragmento de 875 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 7 y la Id. de sec. n.º 10;
 - un fragmento de 291 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 8 y la Id. de sec. n.º 10;
 - un fragmento de 138 pb que usa la combinación del cebador de intersecuencias simples repetitivas (iSSR) de la Id. de sec. n.º 9 y la Id. de sec. n.º 10;

en donde la Id. de sec. n.º 10 es un cebador Operon RAPD® de los kits A-01 a BH-20 10-mer.