

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 021**

51 Int. Cl.:

A01H 5/12 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010** **E 19187124 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** **EP 3603384**

54 Título: **Planta resistente a Bremia**

30 Prioridad:

06.07.2009 EP 09164649

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

14.10.2024

73 Titular/es:

SYNGENTA CROP PROTECTION AG (100.0%)
Rosentalstrasse 67
4058 Basel, CH

72 Inventor/es:

ZONNEVELD, OLAF;
DE LANGE, MICHEL;
BRIGGS, WILLIAM y
SEGURA, VICTOR

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 982 021 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

Planta resistente a *Bremia*

5 La presente invención se refiere a nuevas plantas resistentes a *Bremia*, y a semillas de dichas plantas. La presente memoria descriptiva también se refiere a métodos para obtener este tipo de plantas y para producir semillas de las mismas. La invención se refiere además a marcadores y a su uso en la reproducción asistida por marcadores y para identificar el rasgo de resistencia a *Bremia*.

10 El mildiu veloso es una enfermedad fúngica provocada por el hongo *Bremia lactucae*. Se manifiesta en todo el mundo y representa un gran problema tanto para el rendimiento como para la calidad de la lechuga cultivada (*Lactuca sativa*). El hongo puede infectar la planta de lechuga en cualquier fase de crecimiento, después de lo cual los primeros síntomas de mildiu veloso se vuelven visibles como manchas amarillas cloróticas en la superficie de la hoja. Dentro de
15 las 24-48 horas, se vuelve visible un crecimiento de hongo esponjoso blanco en la superficie inferior de la hoja como una indicación de la formación de esporas. Durante la infección, las manchas de lesiones se vuelven cada vez más grandes y más cloróticas hasta que las hojas se vuelven completamente de un color pardo. La esporulación típica se produce cuando las plántulas de lechuga son susceptibles al mildiu veloso por *Bremia*. En el caso de que las plantas sean homocigotas para el rasgo de resistencia, no se observa esporulación. Cuando un gen de resistencia semi-dominante es heterocigoto, tampoco se observa esporulación, pero a menudo se puede puntuar el amarilleamiento o
20 el pardeamiento de los cotiledones en condiciones ideales de incubación de mildiu veloso por *Bremia*.

Bremia lactucae pertenece al grupo Oomicetos, una clase de hongos relativamente primitiva. Otros miembros de este grupo son, por ejemplo, *Pythium* y *Phytophthora*. *B. lactucae* contiene diferentes especies fisiológicas ("fisios"), es conocido como un patógeno muy variable y es específico para el huésped. Nuevos fisios se producen con relativa
25 frecuencia a través de la mutación de los genes de avirulencia durante la formación de esporas que precede a la propagación de *B. lactucae*.

Dentro del género *Lactuca*, al que pertenece la lechuga cultivada, existen diferentes especies que son resistentes a *Bremia lactucae*. La resistencia se basa generalmente en genes cualitativos, conocidos como genes de resistencia Dm (Dm representa mildiu veloso). El mecanismo de resistencia se conoce como mecanismo gen por gen basado en
30 la interacción específica entre productos del gen de resistencia a Dm y el gen de avirulencia específica para el patógeno (reacción HR) que da como resultado la resistencia de la planta de lechuga. Si un gen de resistencia es completamente dominante, no se observa esporulación de *Bremia*. Sin embargo, si una resistencia es semi-dominante, a menudo no hay esporulación, pero se observa un amarilleamiento/pardeamiento de los cotiledones.

35 Debido a la alta variabilidad del patógeno, que se ha de atribuir a la aparición de mutaciones frecuentes en los genes de avirulencia, la resistencia específica para la raza mediada por los diversos genes de resistencia Dm generalmente se rompe rápidamente por las razas o fisios recientemente emergentes del patógeno *Bremia*.

40 Debido al rendimiento y a la calidad reducidos de la lechuga cultivada (*Lactuca sativa*) provocado por la infestación de la planta de lechuga con el hongo *Bremia*, particularmente *Bremia lactucae*, existe una necesidad no satisfecha de estrategias convenientes y económicamente sostenibles para proteger las plantas, por ejemplo plantas de lechuga como *Lactuca*, contra la infestación por *Bremia lactucae*.

45 La presente invención aborda esta necesidad al proporcionar una planta de *Lactuca sativa*, que es resistente a la infestación por *Bremia lactucae*, y por lo tanto está protegida frente al daño provocado por este patógeno. La provisión de plantas de lechuga resistentes a *Bremia* es una alternativa ecológica para el uso de pesticidas y puede aumentar la eficiencia de las opciones de control biológico y contribuir a programas exitosos de gestión integrada de plagas.

50 El problema técnico subyacente a la presente invención es, por lo tanto, la provisión de una planta de *Lactuca sativa* resistente a *Bremia*, que muestra una resistencia mejorada, particularmente una resistencia general, no específica de raza, a este patógeno en términos de razas conocidas a partir de la fecha de presentación de la presente solicitud, particularmente a razas o aislados de *Bremia* BI1 a BI24, caracterizada y clasificada según el código SEXTET por IBEB (International *Bremia* Evaluation Board).

55 El problema técnico se resuelve mediante la provisión de las reivindicaciones adjuntas.

Además, ahora se ha encontrado sorprendentemente que el ligamiento entre los genes responsables de los cambios morfológicos no deseados en la planta y el gen responsable de la resistencia a *Bremia lactucae*, tal como está presente
60 en el material de origen de tipo salvaje, se rompe y por lo tanto ya no está presente en la planta de *Lactuca sativa* según la invención.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una planta de *Lactuca sativa* resistente a *Bremia lactucae*, en la que el locus de resistencia a *Bremia*, particularmente un locus de resistencia cualitativa a *Bremia lactucae*,
65 particularmente un locus de resistencia de amplio espectro a *Bremia Lactuca*, está ligado a un determinante genético y puede obtenerse del genoma de una planta salvaje de *Lactuca*, particularmente del genoma de *Lactuca saligna*. En

un aspecto específico de la invención, la resistencia a *Bremia lactucae* es una resistencia general, no específica de la raza.

En un aspecto específico adicional de la invención, el rasgo de resistencia se expresa en la planta de *L. sativa* sin la co-expresión de un gen ligado que codifica o controla la expresión de un rasgo agronómicamente indeseable tal como, por ejemplo, crecimiento reducido ("enanismo").

En un aspecto, la presente invención contempla una planta según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el locus de resistencia a *Bremia lactucae* está presente en un estado homocigoto.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una planta según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que dicho locus de resistencia a *Bremia lactucae* está situado en el grupo de ligamiento 8.

En una realización adicional, la presente invención también contempla una planta según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la presencia del locus de resistencia a *Bremia lactucae* se caracteriza por al menos un marcador de ADN representado por un cebador oligonucleotídico de PCR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, o por un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR seleccionados de

- a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,
- b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,
- c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;
- d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8; y
- e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10.

En otra realización, la presente invención también se refiere a una planta de *Lactuca sativa* según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el locus de resistencia a *Bremia lactucae* en *Lactuca saligna* está genéticamente ligado a al menos un locus de marcador, que se co-segrega con el rasgo de resistencia a *Bremia* y puede identificarse en una reacción PCR por al menos un cebador oligonucleotídico de PCR seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, o por un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR seleccionados de

- a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,
- b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,
- c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;
- d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8; y
- e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10.

En una realización adicional, se proporciona una planta de *Lactuca sativa* según cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende al menos un alelo en un locus de rasgo cualitativo en el genoma de *L. sativa* que contribuye a la resistencia a *Bremia lactucae*, que está genéticamente ligado a al menos un locus de marcador, que se co-segrega con el rasgo de resistencia a *Bremia* y que puede identificarse mediante al menos un cebador oligonucleotídico de PCR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, o un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR seleccionados de

- a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,

b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,

c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;

d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8; y

e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10.

En una realización, dicho alelo en el locus del rasgo cualitativo en el genoma de *L. sativa* que contribuye a la resistencia a *Bremia lactucae* se puede obtener de una planta que tiene el antecedente genético de la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1, particularmente de una planta que tiene el antecedente o la arquitectura genética en el locus de rasgo cualitativo de la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1, pero especialmente de una línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1, cuya semilla representativa está depositada en NCIMB con el N° de Acceso NCIMB 41625, o de una progenie o un ancestro de la misma que comprende dicho locus de rasgo cualitativo.

En otra realización como se describe aquí, se proporciona una planta de *Lactuca sativa* según cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende al menos un alelo o parte del mismo en un locus de rasgo cualitativo en el genoma de *L. sativa* que contribuye a la resistencia a *Bremia lactucae*, que es complementario al alelo correspondiente presente en una línea de *Lactuca saligna* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1, depositada bajo el N° de acceso NCIMB 41625, y genéticamente ligado a al menos un locus de marcador dentro del genoma de *L. saligna*, que se co-segrega con el rasgo de resistencia a *Bremia* y puede identificarse mediante al menos un cebador oligonucleotídico de PCR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, o un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR seleccionados de

a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,

b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,

c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;

d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8; y

e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10.

También están comprendidos por la presente invención cebadores, particularmente pares de cebadores, pero especialmente pares de cebadores que consisten en cebadores directos e inversos que exhiben una secuencia nucleotídica que es idéntica a la dada en SEQ ID NOs: 1-10, y su uso para identificar o caracterizar el locus de resistencia a *Bremia*.

En un aspecto de la invención, se incluyen cebadores oligonucleotídicos, particularmente pares de cebadores, pero especialmente pares de cebadores que consisten en un cebador directo y un cebador inverso que exhiben una secuencia nucleotídica que se hibrida con las secuencias nucleotídicas de las secuencias de los cebadores directo e inverso dadas en SEQ ID NOs: 1-10, bajo condiciones de rigurosidad media, particularmente de rigurosidad media a alta, particularmente bajo condiciones de rigurosidad alta, y su uso para identificar o caracterizar el locus de resistencia a *Bremia*.

En una realización de la invención, se proporciona una planta de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2 y par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4 amplifica cada uno un fragmento SSR que se co-segrega con el locus de resistencia a *Bremia*, pero particularmente una planta, en donde

el par de cebadores 1 amplifica un fragmento SSR de 247 pb; y

el par de cebadores 2 amplifica un fragmento SSR de 465 pb.

5 En una realización de la invención, se proporciona una planta de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6 amplifica un fragmento de ADN dentro de la secuencia SSR amplificada por el par de cebadores 1, que comprende un SNP, particularmente un SNP representado por un intercambio de nucleótidos A por C en la posición 272 en la secuencia SSR, que SNP se co-segrega con el locus de resistencia a *Bremia*.

10 En un aspecto específico, dicho SNP que se co-segrega con el locus de resistencia a *Bremia* se puede identificar con una sonda de ADN de SEQ ID NO: 11.

15 En una realización de la invención, se proporciona una planta de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, y par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10 amplifica cada uno un fragmento de ADN dentro de la secuencia SSR amplificada por el par de cebadores 2, que comprende un SNP, particularmente un SNP representado por un intercambio de nucleótidos A por G en la posición 430 en la secuencia SSR, y/o un SNP representado por un intercambio de nucleótidos G por T en la posición 305 en la secuencia SSR, SNP(s) se co-segrega con el locus de resistencia a *Bremia*.

20 En un aspecto específico, dichos SNPs que se co-segregan con el locus de resistencia a *Bremia* se pueden identificar con una sonda de ADN de SEQ ID NO: 13 y una sonda de ADN de SEQ ID NO: 15, respectivamente.

25 En una realización adicional, la presente invención también se refiere a una planta según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que dicha planta es endogámica, un dihaploide o un híbrido.

En otra realización, también se contempla una planta según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que dicha planta es estéril masculina.

30 En un aspecto de la invención, la planta de *Lactuca sativa* según la invención, y como se describe aquí anteriormente, es heterocigota para el rasgo de resistencia a *Bremia*.

En un aspecto de la invención, la planta de *Lactuca sativa* según la invención, y como se describe aquí anteriormente, es homocigota para el rasgo de resistencia a *Bremia*.

35 Una realización específica de la invención se refiere a una planta de *L. sativa* según la invención, y como se describe aquí anteriormente, capaz de resistir infestaciones con *Bremia*, planta la cual es una planta de un grupo de cultivares seleccionados de lechuga mantecosa, lechuga china, lechuga crujiente (formas iceberg), lechuga de hojas sueltas, lechuga romana, y lechuga crujiente de verano.

40 En un aspecto adicional, se describe a material vegetal obtenible de una planta según cualquiera de las realizaciones anteriores, que incluye, pero no se limita a, hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, cultivos celulares o de tejidos, o cualquier otra parte o producto de la planta que todavía exhiba el fenotipo resistente según la invención, particularmente cuando se cultiva en una planta.

45 En otro aspecto como se describe aquí, se describen partes vegetales de una planta según cualquiera de las realizaciones anteriores, que incluyen, pero no se limitan a, semillas de plantas, órganos de plantas, tales como, por ejemplo, una raíz, tallo, hoja, yema floral, o embrión, etc., óvulos, microsporas de polen, células vegetales, tejidos vegetales, cultivos de células vegetales, tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo celular, células en tejidos vegetales, polen, tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diversas fases de desarrollo, etc. que aún exhiben el fenotipo resistente según la invención, particularmente cuando se cultiva en una planta.

50 En una realización adicional de la presente invención, también se proporciona una semilla de una planta homocigota según cualquiera de las realizaciones anteriores.

55 En otra realización, la presente invención contempla además semillas de una planta de *Lactuca sativa* como se reivindica en cualquiera de las realizaciones anteriores, particularmente semilla híbrida, que comprende el determinante genético que contribuye a la resistencia a *Bremia lactucae*.

60 En una realización adicional, las semillas según cualquiera de las realizaciones anteriores se proporcionan por la presente invención, en las que dicho determinante genético es un gen de resistencia ubicado en el grupo de ligamiento 8.

65 La presente memoria descriptiva también describe el uso de *Lactuca sativa* de una cualquiera de las realizaciones anteriores para producir semilla que comprende el determinante genético que contribuye a la resistencia a *Bremia lactucae*, particularmente un gen de resistencia a *Bremia* ubicado en el grupo de ligamiento 8.

En otro aspecto, se proporciona aquí un kit para la detección del locus de resistencia a *Bremia lactucae* en *Lactuca sativa*, en el que dicho kit comprende al menos un cebador oligonucleotídico de PCR, particularmente un cebador oligonucleotídico de PCR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, o un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR, seleccionados de

a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,

b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,

c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;

d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8; y

e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10.

En otro aspecto, se proporciona un kit que contiene, además, una molécula de sonda seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15.

En otro aspecto, se proporciona un marcador de ADN que está ligado al locus de resistencia a *Bremia lactucae* y puede amplificarse por al menos un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10 o por un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR seleccionados de

a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,

b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,

c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;

d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8; y

e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10.

En un aspecto adicional, se proporciona el uso de algunos o todos de estos marcadores de ADN para la selección de diagnóstico del locus de resistencia de la lechuga a *Bremia*, en particular el locus de resistencia a *Bremia* Ls1, en *Lactuca sativa*.

En otro aspecto, se proporciona el uso de algunos o todos estos marcadores de ADN para identificar en una planta la presencia del locus de resistencia a *Bremia lactucae* y/o para monitorizar la introgresión del locus de resistencia de la lechuga a *Bremia lactucae* en *Lactuca sativa*.

En otro aspecto, se proporciona el polinucleótido (producto de amplificación) que se puede obtener en una reacción PCR que implica al menos un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, o un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR, seleccionados de

a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,

b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,

c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;

d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8; y

5 e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10,

10 producto de amplificación el cual corresponde a un producto de amplificación obtenible de la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1 (NCIMB 41625) en una reacción PCR con cebadores o pares de cebadores idénticos, con la condición de que el respectivo locus de marcador todavía esté presente en dicha planta de *Lactuca sativa* y/o pueda considerarse un alelo del mismo.

15 También se describe aquí un polinucleótido que tiene la secuencia de dicho producto de amplificación, y/o un polinucleótido que exhibe una secuencia nucleotídica que se hibrida con las secuencias nucleotídicas de dicho producto de amplificación que se pueden obtener en la reacción PCR anterior.

20 El producto de amplificación de acuerdo con la invención y arriba descrito en esta memoria se puede utilizar para generar o desarrollar nuevos cebadores y/o sondas que se pueden utilizar para identificar el *locus de resistencia a Bremia lactucae*.

25 Por lo tanto, la presente descripción se refiere además, en un aspecto, a marcadores derivados, particularmente a cebadores o sondas derivados, desarrollados a partir de un producto de amplificación según la invención y como se describe aquí anteriormente por métodos conocidos en la técnica, marcadores derivados los cuales están genéticamente ligados al locus de resistencia a *Bremia*, particularmente al locus de resistencia a *Bremia* Ls1, en *Lactuca sativa*.

30 Estos marcadores derivados pueden entonces ser utilizados para identificar plantas resistentes a *Bremia*, en donde los marcadores descritos específicamente en esta memoria se recombinan con respecto a la resistencia y, por lo tanto, ya no está presente en el genoma de la planta resistente.

35 En un aspecto adicional, se proporciona un método ejemplar para introducir al menos un alelo asociado con la resistencia a *Bremia lactucae* en un locus de rasgo cualitativo que contribuye a la resistencia a *Bremia* en una planta de *Lactuca sativa* que carece de dicho alelo, que comprende: a) obtener una primera planta de *Lactuca sativa* según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores; b) cruzar dicha primera planta de *Lactuca sativa* con una segunda planta de *Lactuca sativa*, en el que dicha segunda planta de *Lactuca sativa* carece de dicho alelo; y c) identificar una planta resultante del cruce que exhibe una resistencia incrementada a *Bremia lactucae* y que comprende al menos un alelo marcador que se co-segrega con dicha resistencia a *Bremia*; y d), opcionalmente, aislar dicha planta, y e), opcionalmente, realizar un retrocruzamiento de dicha planta con la primera o segunda planta de *Lactuca sativa*.

40 En un aspecto adicional, se describe un método para obtener una planta de *Lactuca sativa* resistente contra *Bremia lactucae*, que comprende: a) obtener un híbrido F1 cruzando una planta de *Lactuca saligna* con una planta de *Lactuca sativa*, que es sensible a la infestación con *Bremia lactucae*; b) retrocruzar el híbrido F1 con dicha planta de *Lactuca sativa*; y c) identificar una planta resultante del cruce que exhibe resistencia a *Bremia lactucae* y que comprende al menos un alelo marcador que se co-segrega con dicha resistencia a *Bremia*, y d), opcionalmente, cultivar dicha planta.

45 En otro aspecto, se describe un método aquí para obtener semilla según cualquiera de los aspectos anteriores, que comprende las etapas de: a) obtener una primera planta de *Lactuca sativa* según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores; b) cruzar dicha primera planta de *Lactuca sativa* con una segunda planta de *Lactuca sativa*, en el que dicha segunda planta de *Lactuca sativa* carece de dicho alelo; y c) identificar una planta resultante del cruce que exhibe resistencia a *Bremia lactucae* y que comprende al menos un alelo marcador que se co-segrega con dicha resistencia a *Bremia*; y d) cosechar semilla de la progenie de dicho cruce que comprende al menos un alelo marcador que se co-segrega con dicha resistencia a *Bremia*.

50 En un aspecto específico, la planta resultante de uno de los cruces anteriores se identifica en la etapa c) aplicando una reacción PCR usando al menos un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, o un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR, seleccionados de

60 a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,

b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,

65 c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;

d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8; y

5 e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10.

10 En un aspecto específico, la etapa c) del método se complementa además determinando (a) el tamaño del fragmento del producto de amplificación obtenido en una reacción PCR con el par de cebadores 1 y/o el par de cebadores 2, y/o (b) el SNP en el amplicón obtenido en una reacción PCR con el par de cebadores 3, el par de cebadores 4 y el par de cebadores 5, usando una molécula de sonda seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15.

15 En un aspecto adicional, se describe un método según cualquiera de los aspectos anteriores, en el que, en la etapa c), la planta resultante de cualquiera de los cruces anteriores se identifica aplicando una selección fenotípica basada en las plantas que exhiben una resistencia incrementada a *Bremia lactucae*, o mediante una combinación de una selección basada en PCR y una selección fenotípica.

20 En un aspecto adicional, se describe aquí un método para proteger una planta de *Lactuca sativa* contra la infestación con *Bremia lactucae*, que comprende a) obtener una planta de *Lactuca sativa* resistente a *Bremia lactucae* según una cualquiera de las realizaciones anteriores; y b) cultivar dicha planta en un área con alta presión de enfermedad (*Bremia lactucae*).

25 En otro aspecto, se describe el uso de una semilla según uno cualquiera de los aspectos anteriores, para cultivar una planta de *Lactuca sativa* resistente a *Bremia lactucae*.

Definiciones

30 A las expresiones y términos técnicos usados dentro del alcance de esta solicitud generalmente se les da el significado habitualmente aplicado a los mismos en la técnica relevante de mejoramiento y cultivo de plantas si no se indica lo contrario en esta memoria a continuación.

35 Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/o", "una" y "el/la" incluyen sus plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una planta" incluye una o más plantas y la referencia a "una célula" incluye mezclas de células, tejidos y similares.

Una planta cultivada de "*Lactuca sativa*" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a una planta que ya no está en estado natural, sino que se ha desarrollado por el cuidado humano y para uso y/o consumo humano.

40 Se entiende por "alelo", dentro del alcance de la invención, a formas alternativas o variantes de diversas unidades genéticas idénticas o asociadas a diferentes formas de un gen o de cualquier tipo de elemento genético identificable, que son alternativas en herencia debido a que están situadas en el mismo locus en cromosomas homólogos. Tales formas alternativas o variantes pueden ser el resultado de polimorfismos de un solo nucleótido, inserciones, inversiones, translocaciones o deleciones, o la consecuencia de la regulación génica provocada, por ejemplo por modificación química o estructural, de la regulación de la transcripción, o de la modificación/regulación post-traduccional. En una célula u organismo diploide, los dos alelos de un gen o elemento genético dado típicamente ocupan los locus correspondientes en un par de cromosomas homólogos.

50 Un alelo asociado con un rasgo cualitativo puede comprender formas alternativas o variantes de diversas unidades genéticas, incluyendo las que son idénticas o están asociadas con un solo gen o múltiples genes o sus productos, o incluso un gen alterado o controlado por un factor genético que contribuye al fenotipo representado por el locus.

55 Como se usa aquí, la expresión "alelo marcador" se refiere a una forma alternativa o variante de una unidad genética como se define aquí anteriormente, cuando se usa como un marcador para ubicar locus genéticos que contienen alelos en un cromosoma que contribuyen a la variabilidad de los rasgos genotípicos.

60 Como se usa aquí, el término "reproducción", y variantes gramaticales del mismo, se refieren a cualquier proceso que genere un individuo de la descendencia. Las reproducciones pueden ser sexuales o asexuales, o cualquier combinación de las mismas. Tipos no limitativos ejemplares de reproducciones incluyen cruces, autopolinización, generación de derivados haploides duplicados, y combinaciones de los mismos.

65 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "población reproductora establecida" se refiere a una colección de potenciales participantes reproductores producidos por y/o utilizados como parentales en un programa de reproducción; por ejemplo, un programa de reproducción comercial. Los miembros de la población reproductora establecida están típicamente bien caracterizados genética y/o fenotípicamente. Por ejemplo, varios rasgos fenotípicos de interés podrían haber sido evaluados, p. ej., bajo diferentes condiciones ambientales, en múltiples ubicaciones y/o

en diferentes momentos. Alternativamente o además, uno o más loci genéticos asociados con la expresión de los rasgos fenotípicos podrían haber sido identificados, y uno o más de los miembros de la población reproductora podrían haber sido genotipados con respecto al uno o más loci genéticos, así como con respecto a uno o más marcadores genéticos que están asociados con uno o más loci genéticos.

Como se usa en este documento, la frase "individuo diploide" se refiere a un individuo que tiene dos conjuntos de cromosomas, típicamente uno de cada uno de sus dos progenitores. Sin embargo, se entiende que, en algunas realizaciones, un individuo diploide puede recibir sus conjuntos de cromosomas "maternos" y "paternos" del mismo organismo individual, tal como cuando una planta se autopoliniza para producir una generación posterior de plantas.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "homocigótico" se refiere a alelos similares en uno o más locus correspondientes en cromosomas homólogos.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "heterocigótico" se refiere a alelos diferentes en uno o más locus correspondientes en cromosomas homólogos.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "retrocruzamiento" se refiere a un proceso en que una descendencia híbrida se retrocruza repetidamente con uno de los progenitores. Se pueden usar diferentes progenitores recurrentes en retrocruzamientos posteriores.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "locus" se refiere a una región en un cromosoma, que comprende un gen o cualquier otro elemento genético o factor que contribuye a un rasgo.

Como se usa en este documento, "locus marcador" se refiere a una región en un cromosoma, que comprende un nucleótido o una secuencia polinucleotídica que está presente en el genoma de un individuo y que está asociada con uno o más locus de interés, que pueden comprender un gen o cualquier otro elemento o factor genético que contribuya a un rasgo. "Locus marcador" también se refiere a una región en un cromosoma, que comprende una secuencia polinucleotídica complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico usado como sondas.

"Ligamiento genético" se entiende dentro del alcance de la invención que se refiere a una asociación de caracteres de herencia debido a la ubicación de genes en la proximidad en el mismo cromosoma, medidos por porcentaje de recombinación entre loci (centi-Morgan, cM).

Para los fines de la presente invención, el término "co-segregación" se refiere al hecho de que el alelo para el rasgo y el o los alelos para el o los marcadores tienden a transmitirse juntos, debido a que están físicamente cerca en el mismo cromosoma (recombinación reducida entre ellos debido a su proximidad física), lo que da como resultado una asociación no aleatoria de sus alelos como resultado de su proximidad en el mismo cromosoma. La "co-segregación" también se refiere a la presencia de dos o más rasgos dentro de una sola planta, de los cuales se sabe que al menos uno es genético y que no puede explicarse fácilmente por casualidad.

Como se usa en esta memoria, la expresión "arquitectura genética en el locus del rasgo cualitativo" se refiere a una región genómica que está correlacionada estadísticamente con el rasgo fenotípico de interés y representa la base genética subyacente del rasgo fenotípico de interés.

Como se usan en este documento, las expresiones "cruce sexual" y "reproducción sexual", en el contexto de la materia en cuestión divulgada en la presente, se refiere a la fusión de gametos para producir descendencia (por ejemplo, por fertilización, tal como para producir semillas por polinización en plantas). Un "cruce sexual" o una "fertilización cruzada" es, en algunos aspectos, la fertilización de un individuo por otro (por ejemplo, polinización cruzada en plantas). El término "auto-fecundación" se refiere en algunas realizaciones a la producción de semilla por auto-fecundación o auto-polinización; *es decir*, el polen y el óvulo son de la misma planta.

Como se usa aquí, la expresión "marcador genético" se refiere a una característica de un genoma del individuo (por ejemplo, un una secuencia nucleotídica o una secuencia polinucleotídica que está presente en un genoma del individuo) que está asociada con uno o más loci de interés. En algunas realizaciones, un marcador genético es polimórfico en una población de interés, o el locus ocupado por el polimorfismo, dependiendo del contexto. Marcadores genéticos incluyen, por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), índices (*es decir*, inserciones/delecciones), repeticiones de secuencias simples (SSRs), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), ADN polimórficos amplificados al azar (RAPDs), marcadores de secuencia polimórfica amplificada escindida (CAPS), marcadores de Tecnología de Matrices de Diversidad (DArT), y polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), entre muchos otros ejemplos. Los marcadores genéticos pueden usarse, por ejemplo, para localizar loci genéticos que contienen alelos en un cromosoma que contribuye a variabilidad de rasgos fenotípicos. La expresión "marcador genético" también puede referirse a una secuencia polinucleotídica complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico usado como sonda.

Un marcador genético puede ubicarse físicamente en una posición en un cromosoma que está dentro o fuera del locus genético con el que está asociado (*es decir*, es intragénico o extragénico, respectivamente). Dicho de otra manera, mientras que los marcadores genéticos típicamente se emplean cuando no se ha identificado la ubicación en un cromosoma del gen o de una mutación funcional, por ejemplo dentro de un elemento de control fuera de un gen, que corresponde al locus de interés, y hay una tasa de recombinación distinta de cero entre el marcador genético y el locus de interés, la materia objeto descrita en la presente también puede emplear marcadores genéticos que están físicamente dentro de los límites de un locus genético (por ejemplo, dentro de una secuencia genómica que corresponde a un gen, tal como, pero sin limitarse a, un polimorfismo dentro de un intrón o un exón de un gen). En algunas realizaciones la materia objeto descrita en la presente, el uno o más marcadores genéticos comprenden entre uno y diez marcadores, y en algunas realizaciones el uno o más marcadores genéticos comprenden más de diez marcadores genéticos.

Como se usa aquí, el término "genotipo" se refiere a la constitución genética de una célula u organismo. El "genotipo para un conjunto de marcadores genéticos" de un individuo incluye los alelos específicos para uno o más locus marcadores genéticos, presentes en el haplotipo de un individuo. Como se sabe en la técnica, un genotipo puede estar relacionado con un único locus o con múltiples locus, pudiendo estar los locus relacionados o no relacionados y/o ligados o no ligados. En algunas realizaciones, un genotipo de un individuo se refiere a uno o más genes que están relacionados por cuanto el uno o más de los genes están implicados en la expresión de un fenotipo de interés (por ejemplo, un rasgo cuantitativo o cualitativo como se define aquí). Por lo tanto, en algunas realizaciones, un genotipo comprende un resumen de uno o más alelos presentes dentro de un individuo en uno o más loci genéticos de un rasgo cuantitativo o cualitativo. En algunas realizaciones, un genotipo se expresa en función de un haplotipo (definido en este documento más adelante).

Como se usa aquí, el término "germoplasma" se refiere a la totalidad de los genotipos de una población u otro grupo de individuos (por ejemplo, una especie). El término "germoplasma" también puede referirse a material vegetal; por ejemplo, un grupo de plantas que actúan como depósito de diversos alelos. La frase "germoplasma adaptado" se refiere a materiales vegetales de superioridad genética demostrada; por ejemplo, para un entorno o área geográfica dada, mientras que las frases "germoplasma no adaptado", "germoplasma en bruto" y "germoplasma exótico" se refieren a materiales vegetales de valor genético desconocido o no demostrado; por ejemplo, para un entorno o zona geográfica dada; por tanto, la frase "germoplasma no adaptado" se refiere, en algunas realizaciones, a materiales vegetales que no forman parte de una población reproductora establecida y que no tienen una relación conocida con un miembro de la población reproductora establecida.

Como se usa aquí, los términos "híbrido", "planta híbrida" y "progenie híbrida" se refieren a un individuo producido a partir de parientes genéticamente diferentes (por ejemplo, un individuo genéticamente heterocigoto o mayormente heterocigoto).

Como se usa en este documento, la frase "híbrido F₁ de un solo cruce" se refiere a un híbrido F₁ producido a partir de un cruce entre dos líneas endogámicas.

Como se usa en este documento, la expresión "línea endogámica" se refiere a una población genéticamente homocigótica o casi homocigótica. Una línea endogámica, por ejemplo, puede obtenerse mediante varios ciclos de reproducción entre hermanos o de autopolinización o en producción de dihaploides. En algunas realizaciones, las líneas endogámicas reproducen verdaderamente uno o más rasgos fenotípicos de interés. Un "endogámico", "individuo endogámico" o "descendencia endogámica" es un individuo muestreado de una línea endogámica.

Como se usa en este documento, la expresión "línea dihaploide", se refiere a líneas endogámicas estables que han surgido de cultivo de anteras. Algunos granos de polen (haploides) cultivados en medio y circunstancias específicas pueden desarrollar plántulas que contienen *n* cromosomas. Estas plántulas entonces están "duplicadas" y contienen 2*n* cromosomas. La descendencia de estas plántulas se denomina "dihaploide" y esencialmente ya no se segrega (es estable).

Como se usa en este documento, el término "ligamiento" y variantes gramaticales del mismo, se refiere a la tendencia de alelos en diferentes locus en el mismo cromosoma de segregarse juntos más a menudo que lo que se esperaría por probabilidad si su transmisión fuera independiente, en algunas realizaciones como una consecuencia de su proximidad física.

Como se usa aquí, la frase "ácido nucleico" se refiere a cualquier cadena física de unidades monoméricas que puede corresponder a una cadena de nucleótidos, incluido un polímero de nucleótidos (por ejemplo, un polímero típico de ADN, ADNc o ARN), oligonucleótidos modificados (por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden bases que no son típicas de ARN o ADN biológicos, tales como oligonucleótidos 2'-O-metilados), y similares. En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede ser monocatenario, bicatenario, multicatenario, o combinaciones de los mismos. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico de la materia en cuestión divulgada en la presente comprende o codifica opcionalmente secuencias complementarias, además de cualquier secuencia explícitamente indicada.

Como se usa en este documento, la frase "rasgo fenotípico" se refiere al aspecto u otra característica detectable de un individuo, provocada por la interacción de su genoma, proteoma y/o metaboloma con el entorno.

Como se usa en esta memoria, la frase "resistencia" se refiere a la capacidad de una planta de restringir el crecimiento y desarrollo de un patógeno específico y/o el daño que provocan cuando se comparan con plantas susceptibles en condiciones ambientales similares y la presión del patógeno. Las plantas resistentes pueden exhibir algunos síntomas o daños de la enfermedad bajo la presión del patógeno, por ejemplo la presión del patógeno fúngico, tal como la presión del patógeno *Bremia lactucae*.

Como se usa aquí, el término "susceptibilidad" se refiere a la incapacidad de una planta de restringir adecuadamente el crecimiento y el desarrollo de un patógeno específico, por ejemplo un patógeno fúngico, tal como *Bremia lactucae*.

Como se usa aquí, la frase "resistencia a *Bremia*" o "resistencia a razas de *Bremia*" o "planta resistente a *Bremia*" se refiere a la capacidad de las plantas de resistir la colonización por el hongo *Bremia lactucae*, aislados BI:1 a BI:24, como se caracterizan y clasifican según el código SEXTET por IBEB (International Bremia Evaluation Board).

Plantas resistentes no mostrarán o mostrarán muy pocas necrosis con una esporulación nula o muy escasa en las condiciones de ensayo definidas en el Ejemplo 1.5 que figura más adelante .

Como se usa aquí, el término "pluralidad" se refiere a más de uno. Por tanto, una " pluralidad de individuos" se refiere a al menos dos individuos. En algunas realizaciones, el término pluralidad se refiere a más de la mitad del total. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una "pluralidad de una población" se refiere a más de la mitad de los miembros de esa población.

Como se usa en este documento, el término "descendencia" se refiere al vástago o vástagos de un cruce particular. Típicamente, la progenie es el resultado de la reproducción de dos individuos, aunque algunas especies (particularmente algunas plantas y animales hermafroditas) pueden ser auto-fecundadas (*es decir.*, la misma planta actúa como donante tanto de gametos masculinos como femeninos). El vástago o los vástagos pueden ser, por ejemplo, de la generación F₁, la generación F₂ o cualquier generación posterior.

Como se usa aquí, la frase "rasgo cualitativo" se refiere a un rasgo fenotípico que es controlado por uno o unos pocos genes que exhiben efectos fenotípicos importantes. Debido a esto, los rasgos cualitativos típicamente se heredan simplemente. Ejemplos en plantas incluyen, pero no se limitan a, color de la flor, color del fruto y varias resistencias a enfermedades conocidas, tales como, por ejemplo, resistencia a la mancha de hongos.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "selección basada en marcadores" se refiere, por ejemplo, al uso de marcadores genéticos para detectar uno o más ácidos nucleicos de la planta, donde el ácido nucleico está asociado con un rasgo deseado para identificar plantas que portan genes para rasgos deseables (o indeseables), de modo que esas plantas puedan usarse (o evitarse) en un programa de reproducción selectiva.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "microsatélite o marcador de SSR (repeticiones de secuencia simples)" se refiere a un tipo de marcador genético que consiste en numerosas repeticiones de secuencias cortas de bases de ADN, que se encuentran en locus por todo el genoma de la planta y tiene una probabilidad de ser altamente polimórfico.

Se entiende dentro del alcance de la invención que "PCR (reacción en cadena de la polimerasa)" se refiere a un método de producción de cantidades relativamente grandes de regiones específicas de ADN o uno o más subconjuntos del genoma, haciendo posible de ese modo diversos análisis que se basan en esas regiones.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "cebador de PCR" se refiere a fragmentos relativamente cortos de ADN monocatenario usados en la amplificación por PCR de regiones específicas de ADN.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "fenotipo" se refiere a una o más características distinguibles de un rasgo genéticamente controlado.

Como se usa en este documento, la frase "rasgo fenotípico" se refiere al aspecto u otra característica detectable de un individuo, provocada por la interacción de su genoma, proteoma y/o metaboloma con el entorno.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "polimorfismo" se refiere a la presencia en una población de dos o más formas diferentes de un gen, marcador genético o rasgo hereditario o un producto génico obtenible, por ejemplo, a través de empalme alternativo, metilación del ADN, etc.

Se entiende, dentro del alcance de la invención, que "reproducción selectiva" se refiere a un programa de reproducción que usa plantas que poseen o presentan rasgos deseables como progenitores.

Se entiende que la planta "que se va a ensayar" dentro del alcance de la invención se refiere a una planta del género *Lactuca* utilizada para caracterizar genéticamente un rasgo en una planta a ensayar. Típicamente, la planta que se va a ensayar se cruza con una planta "de prueba" y se puntúa la relación de segregación del rasgo en la progenie del cruce.

"Sonda", como se usa aquí, se refiere a un grupo de átomos o moléculas que es capaz de reconocer y unirse a una molécula o estructura celular diana específica, y por lo tanto de permitir la detección de la molécula o estructura diana. Particularmente, "sonda" se refiere a una secuencia de ADN o ARN marcada que puede usarse para detectar la presencia de y para cuantificar una secuencia complementaria por hibridación molecular.

El término "hibridar", como se usa aquí, se refiere a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente a condiciones de hibridación en las que se usa 5xSSPE, SDS al 1%, disolución de Denhardt 1x como una disolución, y/o las temperaturas de hibridación están entre 35°C y 70°C, preferiblemente 65°C. Después de la hibridación, el lavado se lleva a cabo preferiblemente primero con 2xSSC, SDS al 1%, y posteriormente con 0,2xSSC a temperaturas entre 35°C y 75°C, particularmente entre 45°C y 65°C, pero especialmente a 59°C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y disolución de Denhardt, véase Sambrook et al., loc. cit.). Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad, como se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., supra, son particularmente preferidas. Condiciones de hibridación rigurosas particularmente preferidas están presentes, por ejemplo, si la hibridación y el lavado se producen a 65 °C, como se indica anteriormente. Condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo con la hibridación y el lavado llevados a cabo a 45°C, son menos preferidas, y a 35°C, incluso menos.

"Homología de Secuencia o Identidad de Secuencia" se usa aquí indistintamente. Los términos "idénticas" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o proteínas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de residuos aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia, según se miden usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Si las dos secuencias que deben compararse entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia se refiere preferiblemente al porcentaje de los residuos nucleotídicos de la secuencia más corta que son idénticos a los residuos nucleotídicos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia se puede determinar convencionalmente con el uso de programas de computadora como el programa Bestfit (Paquete de Análisis de Secuencia de Wisconsin, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, con el fin de encontrar el segmento con la mayor identidad de secuencia entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene, por ejemplo, una identidad de un 95 % con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferiblemente de modo que el porcentaje de identidad se calcule en toda la longitud de la secuencia de referencia y que se permitan brechas de homología de hasta un 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los denominados parámetros opcionales se dejan preferiblemente en sus valores predeterminados ("por defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias de la invención descritas anteriormente pueden estar provocadas, por ejemplo, por adición, eliminación, sustitución, inserción o recombinación. Dicha comparación de secuencias también se puede realizar preferiblemente con el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, septiembre de 1998 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ejemplos adjuntos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Para este fin, pueden usarse los ajustes de parámetros "por defecto".

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. La frase: "hibridación específicamente con" se refiere a la unión, duplicación o hibridación de una molécula solamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de ADN o ARN (por ejemplo, celular total). "Se une o unen sustancialmente a" se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico que actúa como sonda y un ácido nucleico diana, y abarca emparejamientos incorrectos sin importancia que pueden ajustarse reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación para conseguir la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

Las "condiciones de hibridación rigurosas" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas", en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tales como las hibridaciones de Southern y Northern, dependen de la secuencia y son diferentes para parámetros ambientales diferentes. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, Nueva York. En general, las condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C. más bajas que el punto de fusión térmico para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Normalmente, en "condiciones rigurosas", una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias.

El punto de fusión térmico es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Se seleccionan condiciones muy estrictas para que sean

iguales a la T sub m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro en una transferencia Southern o northern es formamida al 50 % con 1 mg de heparina a 42°C, y llevándose a cabo la hibridación durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es NaCl 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado SSC 0,2 veces a 65°C. durante 15 minutos (véase Sambrook, infra, para una descripción de tampón SSC). A menudo, un lavado de rigurosidad alta va precedido por un lavado de rigurosidad baja para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un ejemplo de lavado de rigurosidad media para una estructura bicatenaria de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 1x a 45 °C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de rigurosidad baja para una estructura bicatenaria de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 4-6x a 40 °C durante 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas implican típicamente concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1,0 M de ion Na, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ion Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente de al menos aproximadamente 30 °C. También se pueden conseguir condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2 veces (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético.

Una "planta" es cualquier planta en cualquier estado de desarrollo, particularmente una planta de semilla.

Una "célula vegetal" es una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una única célula aislada o de una célula cultivada, o como parte de una unidad con una organización superior tal como, por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta entera.

El "cultivo de células vegetales" significa cultivos de unidades vegetales tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo celular, células en tejidos vegetales, polen, tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diferentes estados de desarrollo.

"Material vegetal" o "material vegetal que se obtiene de una planta" se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, cultivos celulares o de tejidos, o cualquier otra parte o producto de una planta.

Un "órgano de una planta" es una parte distinta y visiblemente estructurada y diferenciada de una planta, tal como una raíz, tallo, hoja, yema floral, o embrión.

"Tejido vegetal", como se usa aquí, se refiere a un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional. Se incluye cualquier tejido de una planta en la planta o en cultivo. Esta expresión incluye, aunque sin limitación, plantas enteras, órganos vegetales, semillas de plantas, histocultivo y cualquier grupo de células vegetales organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. El uso de esta expresión junto con, o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido vegetal, como los enumerados anteriormente o que esté contemplado de otra manera por esta definición, no pretende ser exclusivo de ningún otro tipo de tejido vegetal.

Los términos " raza " o " razas " se refieren a cualquier grupo de endogamia, incluidos subgrupos taxonómicos, tales como subespecies, taxonómicamente subordinados a una especie y superordinados a una sub-raza y marcados por un perfil predeterminado de factores latentes de rasgos hereditarios.

La presente invención se refiere a nuevas plantas de *Lactuca sativa*, que son resistentes a la infestación por *Bremia lactucae*, y por lo tanto están protegidas frente al daño provocado por este patógeno. La presente memoria descriptiva también se refiere a métodos de producción y uso de tales plantas.

Las plantas según la invención pueden obtenerse cruzando dos o más genotipos parentales, al menos uno de los cuales puede tener uno o más alelos, particularmente uno o más alelos en loci de rasgos cualitativos correspondientes que contribuyen a la resistencia a *Bremia*, alelo o alelos que carecen del otro genotipo parental o que complementan el otro genotipo para obtener una planta según la invención y como se describe aquí anteriormente. Si más de uno de los loci de rasgos cualitativos contribuye a la expresión del rasgo de resistencia y los dos genotipos parentales originales no proporcionan el conjunto completo de alelos, se pueden incluir otras fuentes en la población reproductora. El otro genotipo parental puede contribuir un rasgo deseable incluyendo la calidad del cultivo exigida por el mercado, tales como, por ejemplo, el aumento de tamaño de la cabeza y el peso, mayor rendimiento de semilla, color exterior verde mejorado o profundo, tolerancia a la sequía y al calor, así como calidades agronómicas mejoradas.

En la lechuga iceberg, por ejemplo, los rasgos deseados comprenden una cabeza apretada y densa que se asemeja a una col. Las lechugas iceberg son generalmente de sabor suave, proporcionan una textura crujiente y exhiben un interior blanco o amarillo cremoso. Las lechugas batavias son cercanas a la iceberg y se caracterizan por una cabeza

más pequeña y menos firme. En relación a la lechuga de cabeza de mantequilla, éstas se caracterizan por una cabeza más pequeña, con una textura mucho más suave, aceitosa y mantecosa. Finalmente, la lechuga romana tiene hojas verticales alargadas y crujientes, formando una cabeza en forma de pan con hojas externas de color verde oscuro.

5 Aparte de la calidad del cultivo, características agronómicamente importantes tales como, por ejemplo, una buena arquitectura de la planta, alta productividad y resistencias básicas a enfermedades, tales como, pero no limitadas al virus del mosaico de la lechuga (LMV), Nasonovia, áfidos de la raíz, virus amarillo occidental de remolacha (BMV), virus del mosaico del nabo (TMV) son rasgos adicionales deseados.

10 En una realización particular de la invención, un gen de resistencia a mildiú veloso se ha identificado en la lechuga salvaje *L. saligna* acceso IVT1306(=CGN05315), que confiere resistencia total a todos las razas conocidas hasta la fecha de *Bremia*. Se introgresó por el rescate de embriones en *L. sativa* cultivada. Extensos ensayos de la enfermedad de las plántulas de *Bremia* en poblaciones F2 y F3 indicaron que la resistencia es provocada por un gen principal (semi)dominante. Esta resistencia derivada de *L. saligna* ("Ls1") puede combinarse con otras resistencias a *Bremia*,
15 tales como R17, R18, R36, R38, Dm3, Lv1 o Crapaudine.

Para el desarrollo del marcador "Ls1" se han desarrollado dos poblaciones de BC4F2 (n = 70) y se ha sometido a ensayo la resistencia a *Bremia* de familias F3 de 70 plantas por línea utilizando diversas cepas de *Bremia*, tales como BI20, BI21, BI24 y BI25. BSA Se pudieron identificar tres candidatos marcadores SSR que muestran un polimorfismo
20 específico entre las líneas R y S parentales y F3.

Los genotipos parentales pueden cruzarse entre sí para producir semilla de progenie. Los genotipos parentales pueden ser líneas endogámicas desarrolladas al autofecundar plantas heterocigotas seleccionadas de campos con polinización no controlada o abierta y empleando procedimientos de selección recurrentes. Las plantas superiores son autofecundadas y seleccionadas en generaciones sucesivas. En las generaciones sucesivas la condición heterocigota
25 da paso a líneas homogéneas como resultado de la auto-polinización y selección. Con generaciones sucesivas de endogamia, la planta se vuelve cada vez más homocigota y uniforme dentro de las plantas de la progenie. Típicamente, se pueden practicar de cinco a siete o más generaciones (F1 a F2; F3 a F4; F4 a F5) de autofecundación y selección de pedigrí para obtener líneas endogámicas que sean uniformes en las características de las plantas y semillas y que
30 se mantendrán uniformes bajo la continua auto-fertilización.

Durante la endogamia, muchos alelos indeseables en loci heterocigotos serán reemplazados por alelos más favorables y los alelos desfavorables o no deseados se eliminarán de la progenie. Además, a través de la selección basada en marcadores, se puede maximizar el número de alelos favorables, debido a que se identifican los alelos más
35 desfavorables y se reemplazan sucesivamente por los alelos más favorables.

En un aspecto, la planta según la invención puede obtenerse introgresando el rasgo de resistencia a *Bremia* de una planta ancestral, particularmente una planta ancestral salvaje, en una planta de lechuga cultivada, particularmente una
40 planta de *Lactuca sativa*, más particularmente una planta de *Lactuca sativa* cultivada.

En una realización específica de la invención, el ancestro salvaje, del cual se puede obtener el rasgo de resistencia a *Bremia*, es *Lactuca saligna*, salvaje, particularmente *Lactuca saligna* IVT1306(=CGN05315), o de una progenie o un ancestro de la misma que comprende dicho locus de rasgo cualitativo. El rasgo de resistencia según la presente
45 invención, que confiere a una planta que expresa este rasgo resistencia a infestaciones con el hongo *Bremia lactucae*, puede, como alternativa, obtenerse de la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1, cuya semilla representativa está depositada en el NCIMB bajo el N° de Acceso NCIMB 41625, o de una progenie o ancestro de la línea LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1 que comprende el rasgo de resistencia a *Bremia*.

Por consiguiente, en una realización específica de la invención, el genotipo parental que contribuye al o a los rasgos de resistencia es una línea endogámica que tiene las propiedades relevantes de la invención de la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1 depositada, es decir, sustancialmente la misma arquitectura del genoma en el locus de rasgo cualitativo asociado con la resistencia a *Bremia*, cuyas muestras de semillas se han depositado
50 el 11 de junio de 2009 ante el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41625.

Para determinar la utilidad de la línea endogámica y su potencial para contribuir genéticamente a la progenie híbrida, se realiza una prueba cruzada con otra línea endogámica, y la progenie resultante se evalúa fenotípicamente.

En otra realización específica de la invención, el genotipo parental que contribuye al o a los rasgos de resistencia es un híbrido que tiene las propiedades relevantes de la invención de la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1 depositada, es decir, sustancialmente la misma arquitectura del genoma en el locus de rasgo cualitativo asociado con la resistencia a *Bremia*, cuyas muestras de semillas se han depositado el 11 de junio de 2009 ante el
60 NCIMB con el número de acceso NCIMB 41625.

La línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1 resultó de un cruce de una *Lactuca saligna* salvaje de acceso IVT1306 (=CGN05315), como el donante del rasgo de resistencia, con una línea endogámica de *Lactuca*
65

sativa. La progenie resistente a *Bremia* de este cruce se cruzó con otras líneas endogámicas de diferentes antecedentes genéticos para obtener finalmente la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1.

Por consiguiente, la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1, o cualquier otra línea de planta que contenga el rasgo de resistencia a *Bremia*, se puede usar como un material fuente para introgresar dicho rasgo de resistencia en cualquier antecedente genético deseado para obtener una planta de lechuga que sea altamente resistente a las infestaciones con el hongo del género *Bremia*, más particularmente a las infestaciones con *Bremia lactucae*, puede contener además uno o más rasgos deseables, tales como rasgos de calidad de cultivo exigidos por el mercado. Aparte de la calidad del cultivo, características agronómicamente importantes, tales como, por ejemplo, una buena arquitectura de la planta, alta productividad y resistencias básicas a patógenos relevantes, tales como el virus del mosaico de la lechuga (LMV), Nasonovia, áfidos de la raíz, virus amarillo occidental de remolacha (BMV), virus del mosaico del nabo (TMV) son rasgos adicionales deseados.

Basado en la descripción de la presente invención, la persona experta que está en posesión de la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1, una muestra de la cual se ha depositado en NCIMB Ltd con el número de acceso NCIMB 41625, o de una progenie o ancestro de la misma que contiene un locus de rasgo cualitativo en el grupo de ligamiento 8 asociado con resistencia a *Bremia*, como se describe aquí, no tiene dificultad para transferir el rasgo de resistencia a *Bremia* de la presente invención a otras plantas de lechuga de diversos tipos usando técnicas de reproducción bien conocidas en la técnica. El rasgo de la presente invención puede transferirse, por ejemplo, a plantas de lechuga de los siguientes grupos de cultivares: cabeza de manteca, lechuga china, cabeza crujiente (formas iceberg), de hoja suelta, romana, crujiente de verano. Por consiguiente, en una realización, una planta de la presente invención es una planta de *L. sativa* capaz de resistir infestaciones con *Bremia*, planta la cual es una planta del grupo de cultivares seleccionado del grupo que consiste en cabeza de mantequilla, lechuga china, cabeza crujiente (formas iceberg), de hoja suelta, romana, y verano crujiente. En una realización de la invención, las plantas de lechuga se cultivan para la producción de semillas (híbridas) o de lechuga comercial.

En otro aspecto, se describe un método para transferir el rasgo de resistencia a *Bremia* según la presente invención a una planta de lechuga que carece de dicho rasgo, que comprende a) obtener una planta que comprende dicho rasgo; b) cruzarla con una planta que carece de dicho rasgo; c) obtener plantas del cruce de la etapa b); d) seleccionar una planta de la etapa c) que sea capaz de resistir infestaciones con *Bremia* según la presente invención. En un aspecto, el método comprende además e) retrocruzar una planta resultante de la etapa d) con una planta de lechuga, y f) seleccionar una planta de lechuga que sea capaz de resistir infestaciones con *Bremia* según la presente invención. En un aspecto, el método comprende además obtener una planta de lechuga endogámica, que es capaz de resistir infestaciones con *Bremia* según la presente invención, y, en un aspecto, el método comprende además cruzar dicha planta de lechuga endogámica con otra planta de lechuga para producir un planta de lechuga híbrida, que es capaz de resistir infestaciones con *Bremia* según la presente invención. En un aspecto, se selecciona una planta de lechuga determinando la presencia o ausencia del hongo, tal como se describe aquí. En una realización, la planta de la etapa a) que comprende dicho rasgo es la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1, cuya semilla representativa está depositada en NCIMB bajo el N° de Acceso NCIMB 41625, o una progenie o ancestro de dicha planta.

En ciertas de la invención, se usa un Ensayo de Resistencia estandarizado, tal como el descrito en el Ejemplo X aquí más abajo, para determinar la presencia o ausencia de una resistencia contra *Bremia* en las plantas de la progenie resultantes de uno de los cruces anteriores, y para seleccionar esas plantas de la progenie para la reproducción adicional que son resistentes a *Bremia*.

Como alternativa, la reproducción asistida por marcadores puede emplearse para identificar aquellos individuos que contienen el locus de resistencia a *Bremia*, y/o los loci de marcadores flanqueantes genéticamente vinculados al mismo, tal como se describe en esta memoria.

La selección basada en marcadores ya puede utilizarse en las fases tempranas del desarrollo endogámico, a menudo en combinación con métodos de rastreo que se basan en gran medida en características fenotípicas que pueden determinarse visualmente y que están relacionadas con índices de rendimiento clave, tales como, por ejemplo, el vigor de la planta, la longitud de entrenudos, las ramificaciones, la resistencia a insectos u hongos, tales como la resistencia a infestaciones de *Bremia*, resistencias a virus, etc., que son relevantes para la idoneidad de la planta para ser utilizada en la producción comercial de híbridos. La selección también puede basarse en marcadores moleculares, que pueden o no estar vinculados a rasgos de interés.

En particular, la selección basada en marcadores puede aplicarse en combinación con o seguida de una selección fenotípica para identificar aquellos individuos en los que todos los loci relevantes de la invención descritos en esta memoria tienen genotipos homocigotos favorables.

Existen varios tipos de marcadores moleculares que se pueden utilizar en la selección basada en marcadores, que incluyen, pero no se limitan a polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmento de restricción amplificada (AFLP), repeticiones de secuencia simple (SSR) y polimorfismos de un solo nucleótido SNP.

El RFLP implica el uso de enzimas de restricción para cortar el ADN cromosómico en sitios de restricción cortos específicos; los polimorfismos resultan de duplicaciones o deleciones entre los sitios o mutaciones en los sitios de restricción.

5 La RAPD usa la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de baja rigurosidad con cebadores individuales de secuencia arbitraria para generar matrices específicas para cepas de fragmentos de ADN anónimos. El método requiere sólo pequeñas muestras de ADN y analiza un gran número de loci polimórficos.

10 El AFLP requiere la digestión de ADN celular con una o más enzimas de restricción antes de usar la PCR y nucleótidos selectivos en los cebadores para amplificar fragmentos específicos. Con este método, usando técnicas de electroforesis para visualizar los fragmentos obtenidos, se pueden medir hasta 100 loci polimórficos por combinación de cebadores, y sólo se requiere una pequeña muestra de ADN para cada uno de los ensayos.

15 El análisis por SSR se basa en secuencias de microsatélites de ADN (repetición corta) que están muy dispersas por todo el genoma de los eucariotas, que se amplifican de forma selectiva para detectar variaciones en repeticiones de secuencias simples. Sólo se requieren pequeñas muestras de ADN para un análisis por SSR. Los SNP usan ensayos de extensión por PCR que detectan de manera eficiente las mutaciones puntuales. El procedimiento requiere poco ADN por muestra. Uno o dos de los métodos anteriores se pueden usar en un programa típico de reproducción basada en marcadores.

20 El método más preferido para lograr la amplificación de fragmentos de nucleótidos que abarcan una región polimórfica del genoma de la planta emplea la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") (Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. 51: 263 273 (1986)), usando pares de cebadores que incluyen un cebador directo y un cebador inverso que son capaces de hibridarse con las secuencias proximales que definen un polimorfismo en su forma bicatenaria.

Se pueden emplear métodos alternativos para amplificar fragmentos, tales como la "Reacción en Cadena de la Ligasa" ("LCR") (Barany, Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 88:189 193 (1991)), que utiliza dos pares de sondas de oligonucleótidos para amplificar exponencialmente una diana específica. Las secuencias de cada uno de los pares de oligonucleótidos se seleccionan para permitir que el par se hibride con secuencias adyacentes de la misma cadena de la diana. Tal hibridación forma un sustrato para una ligasa dependiente del molde. Al igual que con la PCR, los productos resultantes sirven así como un molde en ciclos subsiguientes y se obtiene una amplificación exponencial de la secuencia deseada.

30 La LCR se puede realizar con oligonucleótidos que tienen las secuencias proximal y distal de la misma cadena de un sitio polimórfico. En una realización, cualquiera de los oligonucleótidos se diseñará para que incluya el sitio polimórfico real del polimorfismo. En una realización de este tipo, las condiciones de reacción se seleccionan de manera que los oligonucleótidos pueden ligarse juntos solo si la molécula diana contiene o carece del nucleótido específico que es complementario del sitio polimórfico presente en el oligonucleótido. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden seleccionarse de manera que no incluyan el sitio polimórfico (véase, Segev, Solicitud PCT WO 90/01069).

40 Un método adicional que puede emplearse alternativamente es el "Ensayo de ligamiento de oligonucleótidos" ("OLA") (Landegren et al., Science 241:1077 1080 (1988)). El protocolo OLA utiliza dos oligonucleótidos que están diseñados para ser capaces de hibridarse con secuencias adyacentes de una sola cadena de una diana. La OLA, al igual que la LCR, es particularmente adecuada para la detección de mutaciones puntuales. Sin embargo, a diferencia de la LCR, la OLA da como resultado una amplificación "lineal" en lugar de exponencial de la secuencia diana.

Aún otro método que puede emplear alternativamente es el "Ensayo invasor" que utiliza una endonucleasa flap específica para la estructura (FEN) para escindir un complejo tridimensional formado por la hibridación de oligonucleótidos solapantes específicos para el alelo para un ADN diana que contiene un sitio de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). La reasociación del oligonucleótido complementario al alelo de SNP en la molécula diana desencadena la escisión del oligonucleótido por escisión, una FEN termoestable. La escisión puede ser detectada por varios enfoques diferentes. Lo más comúnmente, el producto de escisión desencadena una reacción de escisión secundaria en un casete de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para liberar una señal fluorescente. Alternativamente, la escisión se puede detectar directamente mediante el uso de sondas de polarización de fluorescencia (FP), o por espectrometría de masas. La reacción de escisión invasiva es altamente específica, tiene una tasa de fracaso baja y puede detectar cantidades de zeptomol de ADN diana. Mientras que el ensayo se ha utilizado tradicionalmente para interrogar a un SNP en una muestra por reacción, se han sometido a ensayo nuevos enfoques basados en chips o perlas para hacer que este ensayo eficiente y preciso sea adaptable a la multiplexación y al genotipado de SNP de alto rendimiento.

60 Nickerson et al. han descrito un ensayo de detección de ácido nucleico que combina atributos de PCR y OLA (Nickerson et al., Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.). 87:8923 8927 (1990)). En este método, la PCR se utiliza para lograr la amplificación exponencial del ADN diana, que luego se detecta utilizando OLA.

También se conocen esquemas basados en el ligamiento de dos (o más) oligonucleótidos en presencia de un ácido nucleico que tiene la secuencia del "di-oligonucleótido" resultante, amplificando con ello el di-oligonucleótido (Wu et al., Genomics 4:560 569 (1989)), y puede adaptarse fácilmente a los propósitos de la presente invención.

En una realización, un marcador molecular es un fragmento de ADN amplificado por PCR, p. ej., un marcador de SSR o un marcador de RAPD. En una realización, la presencia o ausencia de un fragmento de ADN amplificado es indicativa de la presencia o ausencia del rasgo en sí mismo o de un alelo particular del rasgo. En una realización, una diferencia en la longitud de un fragmento de ADN amplificado es indicativa de la presencia de un alelo particular de un rasgo y, por lo tanto, permite distinguir entre diferentes alelos de un rasgo.

En un aspecto específico, los marcadores de la repetición de secuencia simple (SSR) se usan para identificar alelos relevantes para la invención en las plantas parentales y/o sus ancestros, así como en las plantas de la progenie que resultan de un cruce de dichas plantas parentales. Las repeticiones de secuencias simples son secuencias de ADN cortas y repetidas, y están presentes en los genomas de todos los eucariotas y consisten en varias a más de cien repeticiones de un motivo de nucleótido dado. Dado que el número de repeticiones presentes en una ubicación particular en el genoma a menudo difiere entre las plantas, las SSR pueden analizarse para determinar la ausencia o presencia de alelos específicos.

En otro aspecto, los marcadores de SNP de la invención se usan para identificar alelos relevantes para la invención en las plantas parentales y/o sus ancestros, así como en las plantas de la progenie que resultan de un cruce de dichas plantas parentales.

En la presente invención, se puede usar un marcador o un conjunto de dos o más marcadores que comprenden un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR que consisten en un cebador directo y un cebador inverso, seleccionado del grupo del par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2 y par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, cuyos cebadores conducen a un producto de amplificación en una reacción PCR que exhibe un peso molecular o una secuencia nucleotídica, que es esencialmente idéntica o puede considerarse como un alelo al de un producto de amplificación de PCR correspondiente obtenible de la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1 en una reacción PCR con el o los pares de cebadores idénticos.

En una primera etapa, muestras de ADN o ADNc se obtienen a partir de material vegetal adecuado, tal como tejido foliar, extrayendo ADN o ARN utilizando técnicas conocidas. Los cebadores que flanquean una región que contiene las SSR dentro del locus de rasgo cualitativo relevante para la invención descrito aquí anteriormente, o dentro de una región ligada al mismo, se usan entonces para amplificar la muestra de ADN usando el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocido por los expertos en la técnica.

Básicamente, el método de amplificación por PCR implica el uso de un cebador o un par de cebadores que comprenden dos secuencias de cebadores oligonucleotídicos cortas que flanquean el segmento de ADN a amplificar o secuencias de adaptador ligadas a dicho segmento de ADN. Ciclos repetidos de calentamiento y desnaturalización del ADN son seguidos por la reasociación de los cebadores a sus secuencias complementarias a bajas temperaturas, y la extensión de los cebadores reasociados con ADN polimerasa. Los cebadores se hibridan a cadenas opuestas de las secuencias diana de ADN. La hibridación se refiere a la reasociación de las cadenas de ADN complementarias, en que complementaria se refiere a la secuencia de los nucleótidos, de manera que los nucleótidos de una cadena pueden unirse con los nucleótidos en la cadena opuesta para formar estructuras de doble cadena. Los cebadores están orientados de modo que la síntesis de ADN por la polimerasa se realiza de manera bidireccional a través de la secuencia de nucleótidos entre los cebadores. Este procedimiento duplica de manera efectiva la cantidad de ese segmento de ADN en un ciclo. Debido a que los productos de la PCR son complementarios y capaces de unirse a los cebadores, cada uno de los ciclos sucesivos duplica la cantidad de ADN sintetizado en el ciclo precedente. El resultado de este procedimiento es la acumulación exponencial de un fragmento diana específico, que es aproximadamente 2^n , en que n es el número de ciclos.

A través de la amplificación por PCR, se hacen millones de copias del segmento de ADN flanqueado por los cebadores. Las diferencias en el número de secuencias repetidas o inserciones o deleciones en la región que flanquea dichas repeticiones, que se encuentran entre los cebadores flanqueantes en diferentes alelos, se reflejan en variaciones de longitud de los fragmentos de ADN amplificados. Estas variaciones pueden detectarse, por ejemplo, separando electroforéticamente los fragmentos de ADN amplificados en geles o utilizando un secuenciador capilar. Al analizar el gel o perfil, se puede determinar si la planta contiene el alelo deseado en un estado homocigoto o heterocigoto o si el alelo deseado o no deseado está ausente del genoma de la planta.

En la alternativa, la presencia o ausencia del alelo deseado se puede determinar mediante PCR en tiempo real utilizando colorantes de ADN de doble cadena o el método de la sonda informadora fluorescente.

El análisis de marcadores se puede hacer temprano en el desarrollo de la planta utilizando muestras de ADN extraídas del tejido foliar de plantas muy jóvenes o de semillas. Esto permite identificar plantas con una composición genética deseable al comienzo del ciclo de reproducción y descartar plantas que no contengan los alelos deseados relevantes

para la invención antes de la polinización, reduciendo así el tamaño de la población reproductora y los requisitos de fenotipado.

Además, mediante el uso de marcadores moleculares se puede hacer una distinción entre plantas homocigóticas que llevan dos copias del alelo deseado relevante para la invención en el locus cualitativo de resistencia a *Bremia* y plantas heterocigotas que llevan solo una copia y plantas que no contienen copia alguna del o de los alelos favorables.

Por lo tanto, se pueden desarrollar marcadores alternativos por métodos conocidos por el experto en la técnica y se utilizan para identificar y seleccionar plantas con un alelo o un conjunto de alelos de un locus o loci de rasgo cualitativo de acuerdo con la presente invención y como se describe en esta memoria anteriormente.

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del producto de amplificación obtenido en la amplificación por PCR utilizando un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR que consisten en un cebador directo y un cebador inverso seleccionados del grupo del par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2 y par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4 se pueden obtener por los expertos en la técnica y nuevos cebadores o pares de cebadores y diseñados en base a la secuencia de nucleótidos recientemente determinada del producto de amplificación por PCR. Además, los marcadores de acuerdo con la invención y descritos anteriormente en esta memoria podrían colocarse en un mapa genético de lechuga u otras especies, en particular especies de la familia *Asteraceae*, y podrían utilizarse marcadores de mapeo conocidos en la misma región o en regiones homólogas u ortólogas como punto de partida para desarrollar nuevos marcadores.

Por consiguiente, los marcadores específicamente descritos en la presente invención también pueden usarse en la identificación y/o el desarrollo de marcadores nuevos o adicionales asociados con el locus de resistencia cualitativa a *Bremia*, que a su vez se puede usar entonces en la reproducción asistida por marcadores y/o la búsqueda de recombinantes que flanquean el locus de resistencia a *Bremia*, y/o el cartografiado de precisión, y/o la clonación del locus de resistencia cualitativa a *Bremia*.

Existen varios métodos o enfoques disponibles, conocidos por los expertos en la técnica, que se pueden utilizar para identificar y/o desarrollar marcadores en desequilibrio de enlace y/o ligados a y/o localizados en la región de interés, así como marcadores que representan las mutaciones causales reales que subyacen al rasgo cualitativo. Sin ser completamente exhaustivos, algunos enfoques, conocidos por los expertos en la técnica, incluyen:

- *uso de secuencias/marcadores descritos en enfoques de hibridación para identificar otra secuencia en la región de interés*: secuencias de cebadores como se describen aquí, y/o secuencias de marcadores/genos (o parte de las mismas) que se pueden determinar usando las secuencias de cebadores como se describen aquí, se pueden usar como sondas (de hibridación) para aislar secuencias de ácidos nucleicos/genos que flanquean los marcadores y/o que están ligados y/o asociados y/o son específicos para el locus de resistencia a *Bremia* de una muestra de ácido nucleico genómico y/o muestra o conjunto de muestras de ARN o ADNc (por ejemplo, cribado de recursos genómicos tales como cribado de bibliotecas de BAC o bibliotecas de ADNc o ADNc).
- *uso de secuencias/marcadores descritos en enfoques de PCR para identificar otra secuencia en la región de interés*: secuencias de cebadores como se describen aquí, y/o secuencias de marcadores/genos (candidatos) (o parte de las mismas) que se pueden determinar usando las secuencias de cebadores como se describen, se pueden usar como cebadores de amplificación (PCR) para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos/gen que flanquea y/o está ligada y/o asociada con y/o es específica para la región del locus de resistencia a *Bremia* de una muestra de ácido nucleico genómico y/o muestra o conjunto de muestras de ARN o ADNc aisladas o no de un tejido vegetal específico y/o después de un tratamiento específico de la planta y de pimiento o, en principio, de cualquier otro organismo con homología suficiente.
- *uso de secuencias/marcadores descritos en enfoques de PCR para identificar otra secuencia en la región de interés*: las secuencias nucleotídicas/genos de uno o más marcadores se pueden determinar después de que los cebadores internos para dichas secuencias de marcadores se puedan diseñar y usar para determinar secuencias de flanqueo/genos adicionales dentro de la región del locus de resistencia a *Bremia* y/o genéticamente ligados y/o asociados con el rasgo.
- *uso de secuencias/marcadores descritos en enfoques de cartografiado y/o cartografiado comparativo para identificar marcadores en la misma o mismas regiones (posicionamiento del locus de resistencia a *Bremia* en otros mapas)*: basado en la información de posición y/o información de marcador como se describe aquí, los marcadores, de cualquier tipo, se pueden identificar mediante enfoques de cartografiado genético, eventualmente (si es necesario) mediante el posicionamiento de los marcadores descritos (mediante cartografiado genético o extrapolación basada en marcadores comunes a través de mapas) en uno o más mapas genéticos (alta densidad), y/o mapa o mapas genéticos o de consenso integrados. Los marcadores ya conocidos y/o nuevos marcadores genéticamente ligados y/o ubicados en la vecindad de los marcadores descritos y/o la región del locus de resistencia a *Bremia* se pueden identificar y/u obtener y eventualmente

usarse en el cartografiado (de precisión) y/o la clonación del locus de resistencia a *Bremia* y/o aplicaciones de reproducción MAS.

- 5 - *uso de secuencias/marcadores descritos en enfoques 'in-silico' para identificar secuencias/marcadores/genes (candidatos) adicionales:* Secuencias de cebadores tal como se describen en esta memoria y/o secuencias de marcadores/genes (candidatos) (o parte de las mismas) que pueden determinarse utilizando las secuencias de cebadores tal como se describen en esta memoria o basados en marcadores vinculados pueden utilizarse en métodos 'in-silico' para buscar bases de datos de secuencias o proteínas (p. ej., BLAST) para secuencias/genes flanqueantes y/u homólogos (adicionales) y/o diversidad alélica (tanto secuencias genómicas y/o de ADNc o incluso proteínas y ambas originadas a partir del pimiento y/o cualquier otro organismo) genéticamente vinculadas y/o asociadas con los rasgos tal como se describen en esta memoria y/o ubicados en la región del locus de resistencia a *Bremia*.
- 10
- 15 - *uso de secuencias/marcadores descritos en enfoques de cartografiado físico (posicionamiento del locus de resistencia a Bremia en el mapa físico o secuencia del genoma):* secuencias de cebadores como se describe aquí, y/o secuencias de marcadores/genes (o parte de las mismas) que se pueden determinar usando las secuencias de cebadores descritas aquí o usando otros marcadores genéticamente ligados a los marcadores descritos aquí y/o ubicados en la región del locus de resistencia a *Bremia*, se pueden ubicar en un mapa físico y/o secuencia del genoma (completo) en principio de cualquier organismo con homología suficiente para identificar secuencias/marcadores/genes (candidatos) aplicables en (el cartografiado de precisión) y/o la clonación del locus de resistencia a *Bremia* y/o aplicaciones de reproducción MAS.
- 20
- 25 - *uso de secuencias/marcadores descritos para ubicar el locus de resistencia a Bremia en otros mapas (físicos) o genomas (a través de especies.....para lechuga se pueden usar otras especies de Asteraceae como especies modelo):* secuencias de cebadores como se describe aquí, y/o las secuencias de marcadores/genes (o parte de las mismas) que se pueden determinar usando las secuencias de cebadores como se describe aquí, se pueden usar en enfoques de cartografiado de genoma o síntesis comparativos para identificar regiones homólogas y secuencias/genes (candidatos) homólogos y/u ortólogos genéticamente ligados y/o ubicados en la región del locus de resistencia a *Bremia* y aplicable en (el cartografiado de precisión) y/o la clonación del locus de resistencia a *Bremia* y/o aplicaciones de reproducción MAS.
- 30
- 35 - *uso de secuencias/marcadores descritos para seleccionar los individuos apropiados que permiten la identificación de marcadores en la región de interés mediante enfoques genéticos:* las secuencias de cebadores y/o marcadores como se describen aquí se pueden usar para seleccionar individuos con alelos diferentes/contrastantes que, por ejemplo, en enfoques de asociación genética y/o el análisis de segregantes agrupados (BSA, Michelmore et al., PNAS, 88, 9828-9832, 1991) se pueden usar para identificar marcadores/genes en la región específica de interés y/o asociados o genéticamente ligados a los rasgos descritos.
- 40
- 45 - *uso de la información descrita para buscar genes candidatos (posicionales):* la información descrita se puede usar para identificar genes candidatos posicionales y/o funcionales que pueden estar asociados con los rasgos descritos y/o ligados genéticamente.

Para el genotipado, el mapeo o el mapeo de asociación, el ADN se extrae de material vegetal adecuado, tal como, por ejemplo, el tejido de la hoja. En particular, se recogen grandes cantidades de hojas de una pluralidad de plantas. Muestras de ADN se genotipan utilizando una pluralidad de SSRs, SNPs polimórficos, o cualquier otro tipo de marcador adecuado que cubre la totalidad del genoma de la lechuga.

El análisis conjunto de datos genotípicos y fenotípicos se puede realizar utilizando un software estándar conocido por los expertos en la técnica. Las introducciones de plantas y el germoplasma pueden seleccionarse para los alelos en el correspondiente locus de resistencia a *Bremia* descrito aquí, en base a la o las secuencias nucleotídicas del o de los marcadores en el locus/loci de marcador ligados a dicho locus de resistencia a *Bremia* o cualquier otro marcador que se sabe que está ubicado en el cromosoma 8, y el peso molecular del o de los alelos usando una o más de las técnicas descritas aquí o conocidas por los expertos en la técnica.

La secuencia de ácidos nucleicos de los marcadores, los marcadores vinculados o el locus de resistencia a *Bremia* descritos en esta memoria puede determinarse por métodos conocidos por la persona experta. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que comprende dicho locus de resistencia a *Bremia*, o una parte del mismo que confiere resistencia, puede aislarse de una planta donante resistente a *Bremia* fragmentando el genoma de dicha planta y seleccionando aquellos fragmentos que albergan uno o más marcadores indicativos de dicho locus de resistencia a *Bremia*. Posterior o alternativamente, las secuencias marcadoras (o partes de las mismas) indicativas de dicho locus de resistencia pueden utilizarse como cebadores de amplificación (PCR), con el fin de amplificar (a) secuencia(s) de ácidos nucleicos que comprende(n) dicho locus de resistencia a partir de una muestra de ácido nucleico genómico o un fragmento de genoma obtenido de dicha planta. La secuencia de nucleótidos del locus de resistencia a *Bremia*, y/o de cualquier marcador adicional comprendido en el mismo, se puede obtener mediante métodos de secuenciación estándar.

Por lo tanto, la presente memoria descriptiva también describe una secuencia de ácido nucleico aislada (preferiblemente ADN, pero no limitada a ADN) que comprende un locus de resistencia a *Bremia* de la presente invención, o una parte del mismo que confiere resistencia. Por lo tanto, los marcadores descritos pueden utilizarse para la identificación y el aislamiento de uno o más marcadores o genes de lechuga u otros cultivos vegetales, particularmente cultivos de *Asteraceae* que están vinculados o codifican resistencia a *Bremia*.

La secuencia nucleotídica de marcadores adicionales ligados al locus de resistencia a *Bremia* de la presente invención también puede resolverse, por ejemplo, determinando la secuencia nucleotídica de uno o más marcadores asociados con el locus de resistencia a *Bremia*, y diseñando cebadores para dichas secuencias de marcadores, que entonces se pueden usar para determinar adicionalmente la secuencia fuera de dicha secuencia de marcadores. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de los marcadores de SSR descritos en esta memoria o cualquier otro marcador predicho en la región del locus de resistencia a *Bremia* y/o vinculado a dicha región puede obtenerse secuenciando el producto de amplificación por PCR de dichos marcadores mediante métodos bien conocidos en la técnica. O, alternativamente, usando las secuencias de marcadores en una PCR o como sondas de hibridación para identificar secuencias nucleotídicas ligadas mediante por ejemplo, pero sin limitarse a, el cribado de BAC.

Ejemplos

Ejemplo 1: Material y Métodos

1.1 Materiales

- Se han desarrollado dos poblaciones F2 segregante y la correspondiente F3 segregantes para el gen de resistencia a *Bremia* Ls1 para el desarrollo de marcadores mediado por BSA (poblaciones 3043 = línea S [Winnie] * línea R [LSA-1306-158xK175/13xAng-2-45]1:3-2] y población 3045 = línea S [Kristo] * línea R [(Kris/B28-1-19xB06/SAT-79-6)-1-1:2]).
- Secuencias de marcadores candidatos de SSRs NL0918, NL0920 y NL0222, que se identificaron mediante SSR-BSA y se cartografiaron a genes de resistencia a *Bremia* Ls1 en el grupo de ligamiento 8 del mapa de RIL *L. sativa* x *L. serriola* de referencia de lechuga.
- Se obtuvieron secuencias de dos clones EST LE0178 y LK1463 de la colección EST de UC Davis: Estos 2 EST están ubicados en la misma región que el gen Ls1 y los 3 marcadores de SSR vinculados en el grupo de enlace 8.

1.2 Desarrollo del ensayo

Todo el ADN de la planta se aisló según el protocolo de Acetato de potasio + Proteinasa K. Para la secuenciación alélica se diseñaron hasta 3 combinaciones diferentes de cebadores de PCR en los extremos 5' y 3' de SSRs y ESTs vinculados. Los fragmentos de PCR y las secuencias de ADN de estos 5 marcadores potenciales se obtuvieron usando líneas de un panel de líneas resistentes y susceptibles.

El desarrollo del ensayo Taqman EPR se basó en los SNPs específicos para alelos descubiertos del panel de secuencia. El desarrollo del ensayo EPR se realizó de acuerdo con las directrices estándar, incluidas el ensayo de diferentes mezclas de PCR, concentraciones de ADN y temperaturas de reasociación. Las sondas son sondas Taqman FAM y VIC MGB (Eurogentec)

1.3 Protocolos de Ensayo

1.3.1 Protocolo de PCR

1. Aislar ADN genómico con extracción de ADN estándar. Protocolo de Acetato de potasio + Proteinasa K. Finalmente, se obtuvieron 150 µl de solución de ADN.
2. Diluir el ADN del molde a 1/30;
3. Pipetear en pocillos individuales 4µl de cada una de las muestras de ADN diluidas.
4. Cubrir y centrifugar la placa y colocar en hielo;
5. Preparar la mezcla madre. Lo siguiente es por reacción.

1.3.2 Ensayo Taqman EPR

Las sondas marcadas por fluorescencia MGB se pueden adquirir de ABI. La amplificación por PCR se lleva a cabo usando la siguiente mezcla de reacción -

5 Protocolo SIGMA

Mezcla de proyecto de verduras Sigma	Volumen (μL)	Concentración inicial	Concentración final
ADNg	4		
Tampón 10x (Sigma)	1	10 X	
MgCl ₂ 25mM	1,2	25 mM	3mM
dNTP 2,5mM cada uno = 10mM todos	0,8	2,5 mM cada uno	0,2 mM cada uno
Betaina 5M	0	5M	0M
Taq Sigma 2,5U/μl	0,132	2,5U/μl	0,33 U
Sonda tipo VIC (10μM)	0,1	10μM	100nM
Sonda FAM H (10μM)	0,1	10μM	100nM
Cebador directo diana (10μM)	0,2	10μM	200nM
Cebador inverso diana (10μM)	0,2	10μM	200nM
ROX 50X	0,1	50X	0,5X
c.s.p. H ₂ O	2,168		
Volumen Total	10		

Protocolo AmpliTaq Gold

Mezcla de proyecto de verduras Gold	Volumen (μL)	Concentración inicial	Concentración final
ADNg	4		
Tampón II	1	10 X	
MgCl₂ 25mM	1,2	25 mM	3mM
dNTP 2,5mM cada uno = 10mM todos	0,8	2,5 mM cada uno	0,2 mM cada uno
Betaina 5M	0	5M	0M
Gold 5U/μl	0,066	5U/μl	0,33 U
Sonda tipo VIC (10μM)	0,1	10μM	100nM
Sonda FAM H (10μM)	0,1	10μM	100nM
Cebador directo diana (10μM)	0,2	10μM	200nM
Cebador inverso diana (10μM)	0,2	10μM	200nM
ROX 50X	0,1	50X	0,5X
c.s.p. H ₂ O	2,234		
Volumen Total	10		

10

6. Añadir 6μl de mezcla maestra a cada muestra de ADN (todo menos el ADN molde).

7. Centrifugar brevemente;

15

8. Cargar la placa en la máquina de PCR.

9. Programa de PCR en formato de placa ABI GENEAMP PCR 9700- 384 como sigue:

2 min 94°C

20

5 min 72°C

5 Los resultados de SNP se leyeron en un ABI7900.

10. Leer la placa en ABI7900.

1.4 Panel de verificación

10

La verificación se realizó en:

(I) Panel de verificación específico que consiste en 29 genotipos (13 resistentes fijos, 15 susceptibles y 1 línea segregante).

15

(II) 96 genotipos susceptibles (cultivares)

1.5 Ensayo de enfermedad

20

Los ensayos se realizan en una cámara climática con alta humedad. La duración del día es de 16 horas y durante el día la temperatura es de 18°C y la RH es de aproximadamente 85%. Durante la noche la temperatura es de 15°C y la RH ronda el 100%. Antes de la inoculación de un ensayo, las esporas del patógeno *Bremia* se multiplican en variedades susceptibles. La elección de una variedad susceptible para un aislado de *Bremia* se realiza a partir del conjunto oficial de huéspedes diferenciales y de un conjunto interno. El ensayo de la enfermedad para la resistencia a *Bremia* se llevó a cabo usando diversas cepas o aislados de *Bremia* tales como BI20, BI21, BI24 y BI25.

25

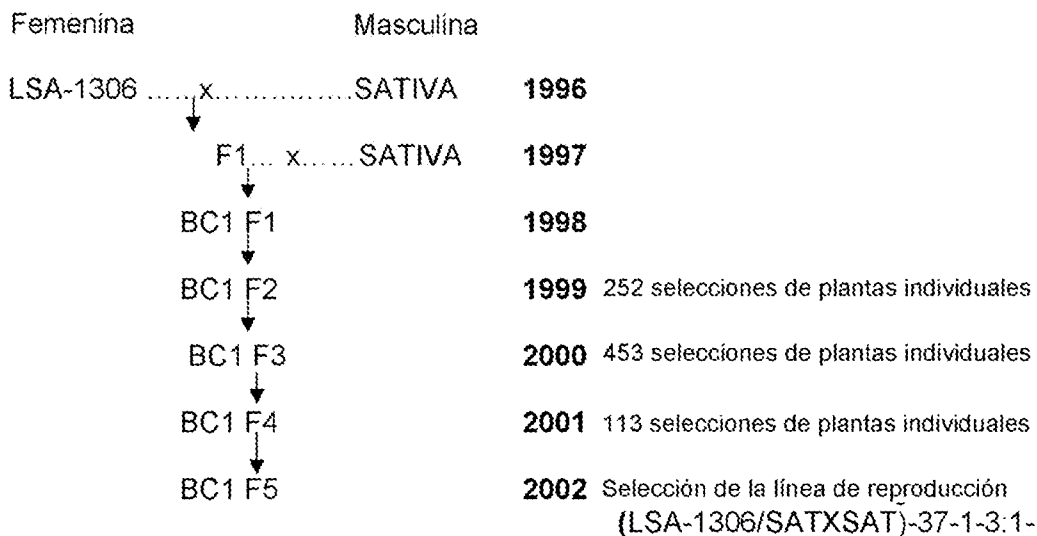
Los aislados de *Bremia* se caracterizan y clasifican de acuerdo con el código SEXTET por IBEB (International Bremia Evaluation Board).

Raza	Código Sextet	Raza	Código Sextet	Raza	Código Sextet
BI:1	11-58-00-00	BI:14	63-62-00-00	BI:25	59-31-42-00
BI:2	63-58-00-01	BI:15	31-31-00-00	BI:26	63-31-58-01
BI:3	56-59-01-00	BI:16	63-31-02-00		
BI:4	27-59-00-00	BI:17	22-59-41-00		
BI:5	05-27-01-00	BI:18	59-31-10-00		
BI:6	27-62-00-00	BI:19	63-62-00-01		
BI:7	47-59-00-00	BI:20	63-31-10-00		
BI:10	63-59-00-00	BI:21	63-31-51-00		
BI:11	57-59-03-00	BI:22	59-63-09-00		
BI:12	57-63-03-00	BI:23	63-31-02-01		
BI:13	21-63-00-00	BI:24	59-31-10-01		

30

Antes de la inoculación del material de ensayo los autores de la invención recolectaron las hojas con esporas y lavaron las esporas de las hojas con agua. La concentración de la suspensión de esporas se ajusta a 100.000 esporas por ml. La suspensión de esporas se rocía sobre plantas de 1 semana de edad (en los cotiledones). 7 a 10 días después de la inoculación se puede hacer la observación/selección. En general, los cotiledones de las plantas susceptibles están completamente cubiertos de esporas. Dependiendo del aislado de *Bremia* usado, los cotiledones de las plantas resistentes no mostrarán o mostrarán un poco de necrosis sin o con muy escasa esporulación.

35

Ejemplo 2: Breve Historia de Reproducción del cv. (LSA-1306/SATxSAT)-37-1-3:1-

La línea de reproducción (LSA-1306 / SATXSAT)-37-1-3:1- se originó en 1996 como resultado de un cruce de LSA-1306 = IVT1306 con una planta de *Lactuca sativa*. El objetivo era obtener una línea de reproducción que combinara rasgos agronómicos y resistencia al mildiu veloso procedente de IVT1306 como donante para extender la reproducción a todos los segmentos principales (lechuga romana, iceberg, Batavia, hoja de roble y cabeza de mantequilla).

Antes de comenzar la selección de pedigrí en 1998, se realizó un primer ciclo de retrocruzamiento para introducir el factor de resistencia a *Bremia* de IVT1306 (= CGN05315: *Lactuca saligna* silvestre originaria de Israel . Instituto Donante: Instituut voor de Veredeling van Tuinbouwgewassen, Wageningen, Países Bajos) que brinda resistencia a todas las razas oficiales de *Bremia* hasta la fecha publicada por IBEB.

La semilla BC1F2 se plantó en 1999 y las plántulas se inocularon con *Bremia* y las plantas resistentes se multiplicaron a ciegas para pasar a F3.

La semilla de BC1F3 se recolectó individualmente de las selecciones de plantas BC1 F2 en 2000. Cada F3 se sembró y se inoculó nuevamente con *Bremia*. Solo se continuó con las líneas F3 homocigotas para la resistencia. Las selecciones en estos F3 homocigóticos se realizaron en términos del mejor valor agronómico que se muestra en el campo abierto.

Las selecciones en BC1 F4 se realizaron en 2001 en campo abierto según los mejores rasgos agronómicos en F3 homocigota resistente.

El BC1F5 más uniforme que combina los rasgos agronómicos deseables y la resistencia a *Bremia* se seleccionó en 2002.

El método de reproducción empleado fue la selección de pedigrí, utilizando prácticas de selección de plantas individuales y de selección en masa.

Ejemplo 3: Identificación del candidato a marcador

El SSR-BSA estándar se realizó usando 400 SSRs amplificables polimórficas: los lotes de BSA resistentes y susceptibles individuales consistían en 8 líneas F3 con cuatro individuos agrupados/línea obtenidos de las 2 poblaciones de desarrollo de marcadores 3043 y 3045. Se identificaron dos SSRs (NL0918 y NL0920), que están ligadas al gen de resistencia Ls1. El enlace se confirmó sometiendo a ensayo plantas individuales de miembros a granel F3.

El genotipado de las poblaciones F2 "madre" 3043 y 3045 correspondientes mostró un enlace perfecto (0 cM) con las plantas F2 fijas (R y S) y hasta un 80% de enlace con plantas F2 heterocigotas (de las cuales las líneas F3 derivadas se segregan por resistencia). Una correlación más baja en plantas heterocigotas se puede explicar, en parte, por ensayos de enfermedad de *Bremia* menos fiables en la segregación de poblaciones F3, ya que otros genes de resistencia a Dm en el fondo perturban el fenotipado adecuado de *Bremia*. El ensayo nuevamente de *Bremia* F3, usando 4 razas *Bremia* específicas diferentes, como BI20, BI21, BI24 y BI25, confirma un ligamiento próximo de 1-2 cM.

RR, SS y HR describe el genotipo del gen de resistencia (resistente a homocigotos, susceptible a homocigotos y resistente a heterocigotos, respectivamente), mientras que R, S e I describían las observaciones del ensayo de enfermedad (resistentes, susceptibles y resistentes intermedias, respectivamente).

Al someter a ensayo el panel de verificación específico con estos 3 SSRs en el secuenciador fluorescente de poliacrilamida ABI7330, se obtuvieron alelos únicos para todas las líneas resistentes (véase la tabla 2). Estos "alelos R" nunca están presentes en las líneas susceptibles sometidas a ensayo que muestran diferentes alelos únicos. Estos datos de verificación (extendidos con 96 líneas susceptibles) demuestran claramente que estos 3 marcadores de SSR muestran especificidad de alelos R y S, lo que potencialmente permite el desarrollo de marcadores Taqman co-dominantes generalmente aplicables en el germoplasma de lechuga.

Se confirmó que el ligamiento próximo mutuo de las dos SSR (NL0918 y NL0920) estaba dentro de 2 cM en el grupo de ligamiento 8 mediante cartografiado con líneas RIL de la *L. sativa* cv. Salinas * *L. serriola* UC23US población de referencia pública. Esto sitúa el gen de resistencia a *Bremia* Ls1 en el grupo de enlace 8.

Se utilizaron secuencias de los 2 marcadores candidatos de SSR y 2 ESTs vinculados para el Desarrollo del Ensayo para el desarrollo del marcador Taqman co-dominante.

Tabla 1 Secuencia de Cebadores para Marcadores de SSR

Marcador de SSR	Cebadores	Tamaño del Fragmento
NL0918	Directo (SEQ ID NO: 1)	Resistente: 247 pb
	5' CCATTAATCCAAAGGCAAC 3'	Susceptible: 222-241 pb
	Inverso (SEQ ID NO: 2)	
	5' CCAGTGAAGGAAGCAAAAG 3'	
NL0920	Directo (SEQ ID NO: 3)	Resistente: 465 pb
	5' GATGGAACCACTTTGGATG 3'	Susceptible: 438-439 pb
	Inverso (SEQ ID NO: 4)	
	5' CCTGCAACAAGATGTGATG 3'	

Tabla 2: Tamaño de diferentes alelos de NL0918 y NL920

Marcador		NL0918	NL0920
ALELO A	A	222	438-439
ALELO B	B	231	465
ALELO C	C	238	
ALELO D	D	241	
ALELO E	E	247	
	F		

Ejemplo 4: Desarrollo del ensayo

Utilizando líneas 4 R y 4 S del panel de verificación específico, los alelos SSR han sido secuenciados, lo que resulta en haplotipos alélicos basados en patrones observados de SNP.

SSR NL0920:

Las líneas R muestran 1 haplotipo (A), mientras que las líneas S muestran 2 haplotipos: Se han desarrollado dos ensayos Taqman basados en SNP 305 # y 430.

SSR NL0918:

Las líneas R muestran 1 haplotipo (A), así como las líneas S (B); se han desarrollado dos ensayos Taqman basados en los SNPs n°s 217 y 272. No se pudo obtener una amplificación específica con SNP 217; sin embargo, el marcador Taqman basado en SNP 272 muestra una correlación perfecta con un panel de verificación específico.

Ejemplo 5: Verificación y ensayo de Robustez

Dos marcadores Taqman desarrollados co-dominantes de los dos SSRs NL0918 y NL0920 fueron verificadas en cuanto a la correlación con líneas de reproducción fenotipadas.

SSR NL0918:

Para SSR NL0918, el marcador Taqman basado en SNP nº 217 no mostró correlación con las líneas en el panel de verificación tanto global como específico. Sin embargo, el marcador Taqman basado en SNP nº 272 muestra una correlación completa con los fenotipos de todas las líneas.

El ensayo del protocolo Taqman de NL0918 mostró una separación discriminativa y una clasificación de los 3 genotipos observados, homocigotos resistentes, heterocigotos, y homocigotos susceptibles (datos no mostrados).

SSR NL0920:

Para SSR NL0920, los marcadores Taqman basados tanto en SNP nº 305 como 430 muestran una correlación completa con los fenotipos de todas las líneas.

El ensayo del protocolo Taqman demostró que SNP nº 430 proporciona una separación discriminativa y la clasificación de los 3 genotipos observados, homocigotos resistentes, heterocigotos, y homocigotos susceptibles.

- Se han desarrollado dos marcadores de PCR Taqman co-dominantes derivados de SSR-BSA para la selección diagnóstica del locus de lechuga Ls1 de resistencia a Bremia.
- Los marcadores discriminan el alelo Ls1 susceptible del alelo LS1 resistente, basándose en una mutación SNP específica en ambos marcadores.
- Los marcadores muestran una correlación perfecta con los fenotipos de las líneas (líneas Ls1 resistentes y susceptibles) y el panel global.

Ejemplo 6: Lectura de Punto Final (EPR) co-dominante de resistencia Ls1 a Bremia de lechuga

Se identificaron tres SNPs, SNP-A, SNP-B y SNP-C, mediante análisis segregante a granel como segregantes con el locus de resistencia. Materiales a granel se seleccionaron por los resultados del cribado con múltiples aislados de Bremia, tales como BI20, BI21, BI24 y BI25, sometidos a ensayo en familias F3 derivadas por autofecundación de plantas F2 individuales a partir de una planta F1 de un cruce entre la fuente de resistencia y Cobham Green, una línea con resistencia a Bremia no conocida. Se determinó un vínculo estrecho entre SNP-A y el locus de resistencia y/o entre SNP-B y el locus de resistencia (en el mejor de los casos, 0,6 cM, pero no más de 5 cM) en tres poblaciones F3 independientes que segregan en cuanto a la resistencia.

La siguiente tabla indica los cebadores y las sondas para los marcadores de SSR y SNP:

Marcador de SNP	Cebadores	Sondas
SNP 272 a partir de SSR NL0918		
SNP-A	Directo (SEQ ID NO: 5)	Resistente (SEQ ID NO: 11):
	5' ATTCCACTTGCATTTATCTGG 3'	FAM-CTACACTCCCACAAT-MGB-NFQ
	Inverso (SEQ ID NO: 6)	Susceptible (SEQ ID NO: 12):
	5' CCCCATTTGATATTTCTTGAT 3'	VIC-ACTCCACAATCT-MGB-NFQ
SNP 430 a partir de SSR NL0920		
SNP-B	Directo (SEQ ID NO: 7)	Resistente (SEQ ID NO: 13):
	5' TGGAAAGATGTGAAATCCATATA 3'	FAM-TGCAGGAGTTAA-MGB-NFQ
	Inverso (SEQ ID NO: 8)	Susceptible (SEQ ID NO: 14):

Marcador de SNP	Cebadores	Sondas
SNP 272 a partir de SSR NL0918		
	5' GAGTTTCAGCTAAGTGTAAATCAAAT 3'	VIC-TGCAGAGAGTTTAAC- MGB-NFQ
SNP 305 a partir de SSR NL0920		
SNP-C	Directo (SEQ ID NO: 9)	Resistente (SEQ ID NO: 15):
	5'TGTGCTCAGTTGATATAAGAATTAGT 3'	FAM- AAGCATGTTTCTTG- MGB-NFQ
	Inverso (SEQ ID NO: 10)	Susceptible (SEQ ID NO: 16):
	5'CCAAATTGGATAAAATAAACCTACAC 3'	VIC- AGCAGGTTTCTTG- MGB-NFQ

Ejemplo 7: Desarrollo de Línea

La resistencia de *Lactuca saligna* está vinculada a varios rasgos no deseados, tales como plantas pequeñas, hojas de espesor de craqueo, hojas de color demasiado oscuro. Al cruzar *Lactuca saligna* con *Lactuca sativa*, el gen se transfiere a *Lactuca sativa* (lechuga normal). Por retrocruzamiento con *Lactuca sativa* y selecciones posteriores en el campo se rompió el enlace entre estos genes no deseados y el gen de resistencia.

Cruces y retrocruces con *L sativa* que muestran introgresión del rasgo desde la fuente hacia la *L sativa* diana.

Se han desarrollado diversas variedades de *Lactuca sativa* que muestran introgresión del alelo resistente de Ls1 de *L. saligna*.

Depósito:

La siguiente muestra de semillas de la línea de *Lactuca sativa* LSA – (1306/SAT x SAT) – 37 – 1 – 3:1 se depositó en NCIMB, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, RU, el 11 de junio de 2009 en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest a nombre de Syngenta Participations AG:

Designación de línea de semillas de <i>Lactuca sativa</i>	Fecha de declaración	Número de Acceso
LSA - (1306/SAT x SAT) - 37 - 1 - 3:1	11. junio de 2009	NCIMB 41625

REIVINDICACIONES

1. Planta de *Lactuca sativa* resistente a *Bremia lactucae*, en la que el locus de resistencia a *Bremia* se puede obtener a partir del genoma de una planta de *Lactuca* salvaje, particularmente del genoma de *Lactuca saligna*, y en la que el locus de resistencia a *Bremia* es un locus de resistencia cualitativo ubicado en el cromosoma 8, y en la que dicho alelo en el locus de rasgo cualitativo en el genoma de *L. sativa* que contribuye a la resistencia a *Bremia lactucae* se puede obtener de una planta que tiene los antecedentes genéticos de la línea de *Lactuca sativa* LSA - (1306/SAT x SAT) - 37 - 1 - 3 :1, cuya semilla representativa está depositada en el NCIMB con el N° de Acceso NCIMB 41625, o de una progenie o un ancestro de la misma que comprende dicho locus de rasgo cualitativo; en la que el locus de resistencia a *Bremia lactucae* está genéticamente ligado a al menos un locus de marcador, que se cosegrega con el rasgo de resistencia a *Bremia* y puede identificarse en una reacción PCR mediante la amplificación de un fragmento de ADN con un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR seleccionados de
 - a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,
 - b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,
 - c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;
 - d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8;
 - y
 - e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10;y en la que el par de cebadores 1 y el par de cebadores 2 amplifican cada uno un fragmento SSR que se cosegrega con el locus de resistencia a *Bremia*, en la que
 - a. par de cebadores 1 amplifica un fragmento SSR de 247 pb; y/o
 - b. par de cebadores 2 amplifica un fragmento SSR de 465 pb; y/o
 - c. par de cebadores 3 amplifica un fragmento de ADN dentro del fragmento SSR de 247 pb que comprende un SNP que se segrega con el locus de resistencia a *Bremia*, particularmente un SNP representado por un intercambio de nucleótidos C por A en la posición 272 en la secuencia de SSR; y/o
 - d. par de cebadores 4 y el par de cebadores 5 amplifican cada uno un fragmento de ADN dentro del fragmento SSR de 465 pb, particularmente un SNP representado por un intercambio de nucleótidos G por A en la posición 430 y un intercambio de nucleótidos T por G en la posición 305 en dicho fragmento SSR, respectivamente.
2. Semilla de una
 - a. planta homocigota según la reivindicación 1; o
 - b. planta de *Lactuca sativa* según la reivindicación 1, que comprende el determinante genético que contribuye a la resistencia a *Bremia lactucae*;en la que el gen de resistencia a *Bremia* está ubicado en el grupo de ligamiento 8.