

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 121**

51 Int. Cl.:

A01H 5/10 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/08 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008** **E 12177635 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** **EP 2517552**

54 Título: **Planta de pimienta mejorada**

30 Prioridad:

13.06.2007 IL 18390207

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

21.10.2024

73 Titular/es:

SYNGENTA CROP PROTECTION AG (50.0%)

Rosentalstrasse 67

4058 Basel, CH y

ZERAIM GEDERA LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

BAR, MOSHE;

NIR, BENJAMIN y

LIFSCHITZ, LIORA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 983 121 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 de pimiento mejorada

La presente invención se refiere, en general, a pimiento sin semillas (SLP); y más específicamente, se refiere al pimiento sin semillas masculino estéril que tiene características únicas como se expone a continuación.

- 5 Los frutos son el resultado del desarrollo del ovario. En el desarrollo normal del fruto, el inicio de la fructificación depende de la finalización con éxito del proceso de polinización y de fecundación, el inicio del desarrollo del fruto es generalmente reprimido hasta que se produzca la fecundación.

En general, el desarrollo completo del fruto sigue a la polinización y la fecundación, y coincide con la maduración de las semillas. Un fruto proporciona un entorno adecuado para el desarrollo de las semillas.

- 10 Factores externos o internos pueden interferir ocasionalmente con el proceso normal de desarrollo del fruto, que luego puede volverse independiente de la polinización y la fecundación tal como en la fructificación partenocárpica. En plantas partenocárpicas, el desarrollo del fruto y la iniciación están desligados de la fecundación. La característica partenocárpica puede conducir al desarrollo de frutos sin semillas o con semillas reducidas sin la polinización y la fecundación. Por lo tanto, partenocarpia se refiere al desarrollo del ovario en frutos sin semillas
15 independientemente del proceso de polinización y/o fecundación.

- La característica partenocárpica es bien conocida en muchas especies vegetales y puede producirse de forma natural o puede inducirse artificialmente con una diversidad de estímulos externos tales como, por ejemplo, aplicación de diferentes hormonas. En la mayoría de las especies, la fuente del fenómeno partenocárpico, que resulta en la producción de frutos sin semillas o con semillas reducidas, puede tener una base genética y/o
20 epigenética. La partenocarpia en vegetales puede ser vista como una mutación que reduce las posibilidades de la planta de sobrevivir y multiplicarse. Se podría lógicamente suponer que las plantas "quieren" ahorrar su energía solo para las frutos que aumentan sus posibilidades de multiplicación, y que, por lo tanto, la evolución buscaría eliminar las plantas que producen frutos sin semillas o frutos iniciados puede caer en el caso de que no se produzca la fecundación. Esta es quizás la razón por la cual el fenómeno partenocárpico es tan raro. En los cultivos, se utiliza
25 esencialmente para dos fines: A): para producir frutos sin semillas, en donde las semillas se consideran indeseables (sandía, pepino) y B): para aumentar el rendimiento cuando las condiciones de fecundación son adversas (tomate, berenjena).

Con frecuencia, la partenocarpia va acompañada de esterilidad tal como en el caso de la sandía, pero la característica también se encuentra como un rasgo independiente tal como, por ejemplo, en el pepino y el tomate.

- 30 La partenocarpia se puede producir de forma natural o puede ser inducida artificialmente. La partenocarpia natural puede tener una base genética y, por lo tanto, puede ser controlada por determinantes genéticos. El rasgo "sin semillas" puede ser obligatorio u opcional, es decir se puede expresar en todo momento o en función de las condiciones ambientales.

- Una partenocarpia inducida artificialmente puede ser el resultado del tratamiento de la planta y/o de la flor y/o del ovario con agentes exógenos tales como extracto de polen muerto, o de la aplicación de sustancias que regulan el crecimiento, ya sean naturales o sintéticas. De hecho, en el cultivo protegido tal como, por ejemplo, en invernaderos, las aplicaciones exógenas de reguladores del crecimiento se utilizan con frecuencia con el fin de inducir la formación de frutos sin semillas con el objetivo de mejorar el rendimiento y la calidad del fruto, pero también en el cultivo a campo abierto para prevenir las pérdidas de producción bajo condiciones adversas. Sin embargo, estas medidas son
35 costosas y requieren mucha mano de obra y, a menudo, también conducen solo a una partenocarpia parcial. Además de ello, el tratamiento químico también puede resultar en un incremento de residuos químicos en los frutos y en el suelo y también se observan, a menudo, malformaciones de los frutos.

- Cultivares de pimiento dulce sin semillas basados en la partenocarpia natural no están disponibles todavía; por lo tanto, se utilizó la manipulación química para inducir artificialmente la partenocarpia. Auxinas, giberelinas y citoquininas (Sjut y Bangerth, 1982/83; Kim et al., 1992), así como inhibidores del transporte de auxina (Beyer y Quebe-
45 deaux, 1974; Kim et al., 1992), han sido aplicadas todas con éxito a varios cultivos de vegetales con fruto.

- La calidad del fruto y el rendimiento dependen generalmente de la cantidad de semillas presentes en el fruto. Los altos números de semillas conducen generalmente a un aumento en el tamaño y la calidad del fruto. El rendimiento y la calidad del fruto del pimiento son particularmente bien conocidos por ser altamente dependiente de la cantidad de semillas. Por otra parte, el pimiento es generalmente muy sensible a la fructificación. Una vez que la planta comienza este proceso, emplea la mayoría de su energía para la fructificación. Como resultado de esta competencia por recursos limitados de energía y asimilación, se inhibe la subsiguiente fructificación y desarrollo de los frutos, así como el crecimiento de las hojas, ramas y raíces. Un número creciente de semillas reduce adicionalmente el crecimiento de las plantas.
- Esta sensibilidad de las plantas de pimiento a la fructificación es una de las razones del fenómeno de "lavado", lo que conduce a fluctuaciones cíclicas de fructificación y, por lo tanto, en la cosecha del pimiento alternando semanas de alta cosecha con semanas de baja cosecha. Este modelo de recolección irregular es un problema importante para los productores de pimiento, ya que hace que sea difícil para los productores satisfacer la demanda del mercado durante las campañas de crecimiento y, además, conduce a fluctuaciones en la demanda de trabajo en los invernaderos.
- En otras especies, tomate, por ejemplo, la sensibilidad a la fructificación es mucho menor. Los tomates pueden producir una cosecha relativamente buena y de frutos de buena calidad, incluso cuando éstos tienen pocas semillas, o pueden continuar creciendo incluso cuando los frutos tienen una gran cantidad de semillas. Herramientas artificiales pueden garantizar una fructificación en algunas especies en donde las condiciones de fertilidad son adversas. En el tomate, la pulverización de una hormona especial (auxina) puede inducir la fructificación, incluso sin semillas.
- Heuvelink y Körner (2001) pusieron a prueba la hipótesis de trabajo de que el cultivo de frutos partenocárpicos en plantas de pimiento puede al menos reducir el problema de lavado en el crecimiento del pimiento y proporcionar además frutos de pimiento de alta calidad.
- Heuvelink y Körner (2001) indujeron el crecimiento de frutos partenocárpicos en pimiento al impedir la auto-polinización y la aplicación de auxina al estigma. Pudieron confirmar que el crecimiento partenocárpico del fruto resultó en una fructificación y una cosecha más regular y, por lo tanto, tiene el potencial de reducir el problema de lavado.
- La inducción del crecimiento partenocárpico por aplicación externa de hormonas vegetales u otros agentes inductores es, sin embargo, laboriosa y costosa y puede plantear problemas medioambientales debido a cantidades incrementadas de residuos químicos sobre o en los frutos o el suelo. Este enfoque, por tanto, no es práctico para la producción comercial del pimiento. Existía, por tanto, una necesidad de soluciones genéticas que eviten las fluctuaciones cíclicas en la cosecha del pimiento, pero que en su lugar garanticen un suministro continuo de frutos de pimiento de alta calidad.
- La presente invención ofrece ahora una solución que es adecuada para el uso comercial, proporcionando una planta de pimiento partenocárpica que desarrolla frutos sin semillas, en donde la fructificación de frutos sin semillas es independiente del proceso de polinización y de fecundación y/o del tratamiento con agentes exógenos, pero es controlada por un determinante genético que es estable y, por lo tanto, puede ser heredado de forma estable por plantas de la progenie e introgresado en variedades comerciales de pimiento.
- Esta invención también ofrece la ventaja de mejores opciones para controlar insectos y enfermedades. Enfermedades virales del pimiento se transmiten generalmente por pulgones. Estos insectos pueden ser controlados con el uso de medios mecánicos tales como redes de tejido. Estas medidas de control de insectos tienen, sin embargo, el inconveniente de que también a los insectos beneficiosos se les impide el acceso a las plantas de pimiento y, por lo tanto, no se puede producir una polinización mediada por insectos. La presente invención permite ahora proteger plantas de pimiento frente a infestaciones de áfidos y, por lo tanto, de las infecciones por virus transmitidos por áfidos, sin interferir en la fructificación normal y en la recolección de frutos y sin necesidad de plaguicidas químicos, reduciendo así los costos de control de insectos y enfermedades.
- En particular, la presente invención proporciona una planta de pimiento, que desarrolla frutos sin semillas, en el que el rasgo "sin semillas" es controlado por un determinante genético independiente del proceso de polinización y fecundación y también independiente del tratamiento con hormonas vegetales inductoras de partenocarpia, incluyendo auxinas, giberelinas y citoquinas, inhibidores del transporte de auxina, u otros y/u otros factores exógenos inductores de partenocarpia y/o agentes inductores de partenocarpia administrados exógenamente tales

como sustancias reguladoras del crecimiento, ya sean naturales o sintéticas, o extractos vegetales tales como, por ejemplo, extracto de polen muerto.

- 5 En una realización de la invención, se proporciona una planta de pimiento, que desarrolla frutos sin semillas, en donde el rasgo "sin semillas" es controlado por un determinante genético e independiente del tratamiento exógeno con hormonas vegetales inductoras de partenocarpia.

En una realización, dicha planta de pimiento de acuerdo con la invención desarrolla frutos sin semillas independientes de tratamiento con hormonas vegetales seleccionadas del grupo que consiste en auxinas, giberelinas y citoquinas, inhibidores del transporte de auxina, y otros.

- 10 En una realización de la invención, se proporciona una planta de pimiento, que desarrolla frutos sin semillas, en donde el rasgo "sin semillas" es independiente del proceso de polinización y fecundación.

En una realización, dicha planta de pimiento de acuerdo con la invención desarrolla frutos sin semillas, que son al menos 95%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% sin semillas.

En una realización, dicha planta de pimiento de acuerdo con la invención desarrolla frutos sin semillas, que son 100% sin semillas.

- 15 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde al menos el 40%, particularmente al menos el 50%, particularmente al menos el 60%, particularmente al menos el 70%, particularmente al menos el 80%, particularmente al menos el 90%, pero especialmente el 100% de las frutos desarrollados en dicha planta son sin semillas.

- 20 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde al menos el 40%, particularmente al menos el 50%, particularmente al menos el 60%, particularmente al menos el 70%, particularmente al menos el 80%, particularmente al menos el 90%, pero especialmente el 100% de las frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son al menos el 95%, particularmente al menos el 98%, particularmente al menos el 99% sin semillas.

- 25 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde al menos el 40% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son al menos el 95%, particularmente al menos el 98%, particularmente al menos el 99% sin semillas.

En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde al menos el 60% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son al menos el 95%, particularmente al menos el 98%, particularmente al menos el 99% sin semillas.

- 30 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde al menos el 70% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son al menos el 95%, particularmente al menos el 98%, particularmente al menos el 99% sin semillas.

- 35 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde al menos el 80% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son al menos el 95%, particularmente al menos el 98%, particularmente al menos el 99% sin semillas.

En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde al menos el 90% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son al menos el 95%, particularmente al menos el 98%, particularmente al menos el 99% sin semillas.

- 40 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde al menos el 95% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son al menos el 95%, particularmente al menos el 98%, particularmente al menos el 99% sin semillas.

En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde al menos el 99% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son al menos el 95%, particularmente al menos el 98%, particularmente al menos el 99% sin semillas.

- 5 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde el 100% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son al menos el 95%, particularmente al menos el 98%, particularmente al menos el 99% sin semillas.

En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde el 40% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son 100% sin semillas.

- 10 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde el 60% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son 100% sin semillas.

- 15 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde el 80% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son 100% sin semillas.

En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde el 90% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son 100% sin semillas.

- 20 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde el 95% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son 100% sin semillas.

En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde el 98% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son 100% sin semillas.

- 25 En una realización, se proporciona una planta de acuerdo con la invención y como se describe antes en esta memoria, en donde el 100% de los frutos desarrollados en dicha planta son frutos sin semillas, que son 100% sin semillas.

En particular, la presente invención proporciona una planta pimienta de acuerdo con la invención y como se describe en esta memoria, que desarrolla frutos sin semillas que son comestibles y de alta calidad.

- 30 En una realización, la presente invención proporciona una planta de pimienta que desarrolla frutos sin semillas que son comestibles y de alta calidad, y son adecuados para ser utilizados como productos frescos, como productos cortados frescos o para el procesamiento tal como, por ejemplo, el enlatado.

- 35 En una realización, dicha planta de pimienta de acuerdo con la invención es capaz de hacer fructificar frutos sin semillas en toda la planta. En particular, la fructificación se inicia en los primeros nudos de una rama y progresa a lo largo de la longitud de toda la rama. En una realización, dicha planta desarrolla particularmente dos frutos por nudo en aproximadamente el 20%, en particular en aproximadamente el 40%, en particular en aproximadamente el 60% de los nudos.

- 40 En una realización, dicha planta de pimienta de acuerdo con la invención muestra fructificación en todas las campañas, es decir, también en condiciones desfavorables en el contexto de las condiciones climáticas de Israel o climas equiparables.

En una realización, dicha planta de pimienta de acuerdo con la invención desarrolla frutos de aspecto normal, que cumplen con las normas de calidad comercial tal como se define, por ejemplo, en los Normas para Calidad de Pimientos de los Estados Unidos (USDA, Agricultural Marketing Service, Fruit and Vegetable Programs, Fresh Products Branch).

Todavía en otro aspecto de la invención, la planta de acuerdo con la invención y tal como se describe antes en esta memoria porta frutos que, en la madurez, pesan más de 2 gramos o son más largos que 1 cm y tienen un diámetro de más de 0,5 cm, cuando dicha planta es cultivada bajo condiciones de crecimiento generalmente utilizadas por los cultivadores de la práctica regular de cultivo, en campo abierto o en cultivo protegido.

- 5 La planta de pimiento de acuerdo con la invención y tal como se describe antes en esta memoria puede desarrollar un pimiento dulce incluyendo un pimiento de tipo dulce, un pimiento campana, un pimiento rectangular grande, un pimiento cónico, un pimiento largo cónico o un pimiento de tipo blocky. El fruto de dicha planta en la madurez puede ser siempre verde, un fruto amarillo, naranja, marfil, marrón, púrpura o rojo.

- 10 La planta de acuerdo con la invención puede ser una planta de chile picante, p. ej., un pimiento ligeramente picante utilizado para el mercado en fresco y para procesamiento, incluido el pimiento largo, en forma de corazón, de pulpa fina tipo Ancho y el pimiento largo, de extremos romos, de pulpa fina de tipo Tuscan, el fruto de pimiento Chile ligeramente más picante con un grosor medio de la pulpa, y un pimiento picante utilizado tanto en el mercado de productos frescos como de procesamiento, incluido el Jalapeño largo, de pulpa gruesa cilíndrica, el Serrano pequeño, delgado, ahusado y el pimiento Cayenne de pulpa fina y de forma irregular.

- 15 La planta de acuerdo con la divulgación y tal como se describe antes en esta memoria puede ser endogámica, dihaploide o híbrida y/o macho estéril.

En una realización, dicha planta de pimiento de acuerdo con la invención y tal como se describe en esta memoria es macho estéril.

- 20 En una realización, se proporciona una planta de pimiento, particularmente una planta de pimiento sin semillas de acuerdo con la invención y tal como se describe en esta memoria, que desarrolla frutos de pimiento que son pigmentados de color rojo en la fase de madurez y pigmentados de color verde en la fase de pre-madurez (sin madurar).

- 25 En una realización de la invención, dicho frutos de pimiento en la madurez tienen un sabor muy dulce con un Brix entre aproximadamente 7° y aproximadamente 14°, en particular entre aproximadamente 7,5° y aproximadamente 12°, en particular entre aproximadamente 8° y aproximadamente 11°.

En una realización de la invención, dichos frutos de pimiento tienen una forma similar a cónica, es decir, entre campana y cónica clásica y un tamaño de entre aproximadamente 2 y 4 cm por aproximadamente 3 a 4 cm de diámetro.

- 30 En una realización, se proporciona una planta de pimiento, particularmente una planta de pimiento sin semillas de acuerdo con la invención y tal como se describe en esta memoria, que desarrolla un fruto de pimiento que está pigmentado de color rojo en la fase de madurez y pigmentados de color verde oscuro en la fase de pre-madurez (sin madurar); tiene un sabor muy dulce con un Brix entre aproximadamente 7° y aproximadamente 14°, en particular entre aproximadamente 7,5° y aproximadamente 12°, en particular entre aproximadamente 8° y aproximadamente 11°; tiene una forma similar a cónica, es decir, entre campana y cónica clásico y un tamaño entre aproximadamente 2 y 4 cm por aproximadamente 3 a 4 cm de diámetro.

- 40 En una realización, la planta de pimiento de acuerdo con la invención y tal como se describe en esta memoria contiene un rasgo "sin semillas", que se puede obtener a partir de una planta de pimiento híbrido seleccionado del grupo de híbridos que consisten en *Capsicum annuum* AR07-F1-56-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-87-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-166-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-171-X; y *Capsicum annuum* AR07-F1-172-X. Semillas para el cultivo de estas plantas híbridas han sido depositadas ante la NCIMB, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, Reino Unido el 26 de mayo de 2008, bajo el número de acceso NCIMB 41558, NCIMB 41559, NCIMB 41560, NCIMB 41561 y NCIMB 41562, respectivamente.

- 45 En una realización de la invención, el rasgo "sin semillas" o una planta que comprende dicho rasgo se puede obtener a partir de cualquiera de las líneas híbridas cultivadas a partir de las semillas depositadas por el desarrollo de la progenie F2 de dicho híbrido. En particular, el rasgo "sin semillas" o una planta que comprende dicho rasgo se puede obtener a partir de cualquiera de las líneas híbridas depositados i) mediante germinación de semillas de dichas líneas y hacer crecer una, planta fértil y madura a partir de la misma; ii) mediante inducción de la auto-polinización de dicha planta desarrollada bajo (i), desarrollo de frutos y recolección de las semillas fértiles de los

mismos, y iii) cultivo de plantas de las semillas recolectadas bajo ii) y la selección de plantas que desarrollan frutos sin semillas.

5 En una realización, la invención se refiere a material vegetal que se puede obtener a partir de una planta de acuerdo con la invención y tal como se describe en esta memoria antes de incluir, pero sin limitarse a los mismos, hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, células huevo, cigotos, semillas, esquejes, callos o cultivos de tejidos, o cualquier otra parte o producto de la planta que todavía exhiba el fenotipo sin semillas de acuerdo con la invención, particularmente cuando se cultiva en una planta.

10 La invención se refiere, además, a partes de las plantas que se pueden obtener a partir de una planta de acuerdo con la invención y tal como se describe en esta memoria antes de incluir, pero sin limitarse a los mismos, semillas de plantas, órganos de plantas tales como, por ejemplo, una raíz, tallo, hoja, brote de flor, o embrión, etc, óvulos, microesporas de polen, células vegetales, tejido vegetal, cultivos de células vegetales tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo celular, células en tejidos vegetales, polen, tubos de polen, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diversas etapas de desarrollo, etc; que todavía exhiben el fenotipo sin semillas de acuerdo con la invención, particularmente cuando se cultiva en una planta.

15 La invención se refiere, además, a un método agronómico de la producción de frutos sin semillas de pimiento, que comprende las etapas de

- i) proporcionar una planta de pimiento de acuerdo con la invención y tal como se caracteriza antes en esta memoria;
- ii) multiplicar/propagar dicha planta de pimiento;
- 20 iii) permitir que la planta desarrolle frutos de pimiento sin semillas; y
- iv) recolectar dichos frutos de pimiento;

en donde, la multiplicación o propagación de la planta de pimiento se realiza por propagación vegetativa.

La invención se refiere, además, a un método de producción de una planta de pimiento sin semillas que comprende las etapas de

- 25 i) proporcionar semillas de un híbrido F1 generado cruzando una planta de pimiento sin semillas como línea hembra con una planta de pimiento (portadora de semillas) macho fértil como línea macho;
- ii) germinar dicha semilla y cultivar una planta fértil, madura a partir de ella;
- iii) inducir la autopolinización de dicha planta cultivada en (ii), cultivar frutos y recolectar las semillas fértiles a partir de ellos, y
- 30 iv) cultivar plantas a partir de las semillas recolectadas en iii) y seleccionar plantas en las que crecen frutos sin semillas.

35 En un aspecto, la semilla híbrida utilizada en dicho método de acuerdo con la divulgación es la semilla híbrida, que se puede obtener a partir de una planta de pimiento híbrido seleccionada del grupo de híbridos que consisten en *Capsicum annuum* AR07-F1-56-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-87-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-166-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-171-X; y *Capsicum annuum* AR07-F1-172-X, que se desarrollan a partir de semillas depositadas ante el NCIMB, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, Reino Unido el 26 de mayo de 2008, bajo los números de acceso NCIMB 41558, NCIMB 41559, NCIMB 41560, NCIMB 41561 y NCIMB 41562, respectivamente.

Breve Descripción de las Figuras

40 Figura 1: Planta SLP en el invernadero, pueblo Netiv Haasara Israel. La variedad tipo "one bite" "AR06-F3-255-1". Esta variedad se utilizó como fuente de SLP en los híbridos depositados.

Figura 2: Frutos de la variedad SLP Yellow blocky "SD07-3-5", como resultado del híbrido entre "AR06-F3-255-1" y una planta F2 de una variedad de pimiento yellow blocky.

Figura 3: Frutos de la variedad SLP Red conic "SD07-2-77", como resultado del híbrido entre "AR06-F3-255-1" y una planta F2 de una variedad de pimiento rojo tipo Kapya.

5 Definiciones

Los términos y expresiones técnicos utilizados en el ámbito de esta solicitud se dan generalmente con el significado general aplicado a ellos en la técnica pertinente de cría y cultivo de plantas si no se indica lo contrario en esta memoria en lo que sigue.

10 Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el", "la" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto dictamine claramente lo contrario. Así, 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.

15 "Partenocarpia", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la producción de frutos sin fecundación y permite obtener frutos sin semillas. La partenocarpia es favorecida por ciertas condiciones ambientales tales como temperaturas diurnas o nocturnas altas o bajas, un bajo nivel de luz y alta humedad. La partenocarpia puede producirse de forma natural o puede inducirse artificialmente. La partenocarpia natural es producida por causas (epi)genéticas y puede ser obligatoria u opcional, en otras palabras, dependiendo de las condiciones medioambientales.

20 "Fruto de pimiento sin semillas", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un fruto de pimiento obtenido independientemente del proceso de polinización y/o fecundación, y/o independientemente del tratamiento con hormonas vegetales inductoras de partenocarpia y/u otros factores exógenos inductores de partenocarpia y/o agentes inductores de partenocarpia exógenamente administrados.

Una fruto de pimiento sin semillas que es "95%" sin semillas se refiere a un fruto en el que solo el "100 - 95%" de los ovarios presentes en dicha fruto, es decir, el 5% de los ovarios se desarrollan en semillas.

25 Una "planta de pimiento sin semillas", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una planta de pimiento que desarrolla un fruto de pimiento sin semillas tal como se define en esta memoria, incluyendo una planta de pimiento en la que al menos el 95%" de los frutos presentes en dicha planta de pimiento son sin semillas.

Tal como se utiliza en esta memoria, "fruto comestible" y "fruto comestible fresco" se refieren a frutos recogidos de la planta que son adecuados para el consumo humano.

30 Tal como se utiliza en esta memoria, "factores o agentes exógenos" se refieren a factores o agentes que tras la aplicación exógena a la planta, particularmente a las partes reproductoras de la planta tales como, por ejemplo, el estigma, son capaces de inducir una partenocarpia artificial en la planta tratada. Tales "factores o agentes exógenos" pueden ser, por ejemplo, extracto de polen muerto, sustancias reguladoras del crecimiento, ya sea naturales o sintéticas tales como hormonas vegetales que incluyen auxinas, giberelinas y citoquinas, inhibidores del transporte de auxina, u otros.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "rasgo" se refiere a la característica o fenotipo, p. ej., el color del fruto maduro o una resistencia a las enfermedades tales como la resistencia a TSWV. Un rasgo puede ser heredado de una manera dominante o recesiva, o de manera parcial o incompleta dominante. Un rasgo puede ser monogénico (es decir, determinado por un solo locus) o poligénico (es decir, determinado por más de un locus) o también puede resultar de la interacción mutua entre los genes o la interacción de uno o más genes con el medio ambiente. Un rasgo dominante resulta en una manifestación fenotípica completa en el estado homocigoto o heterocigoto; un rasgo recesivo se manifiesta solo cuando están presentes en estado homocigoto.

40 El término "pericarpio" tal como se conoce en la técnica se refiere a la pared de un ovario madurado. Específicamente, el pericarpio del fruto del pimiento se refiere a la pared del fruto, que es la parte coloreada y comestible del fruto del pimiento. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "pericarpio grueso" se refiere a

una anchura del pericarpio de al menos 5 mm, preferiblemente de al menos 8 mm. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "autofecundación" se refiere a una auto-polinización controlada de una planta, es decir, el contacto del polen y el óvulo producidos por la misma planta. El término "cruce" se refiere a una polinización cruzada controlada, es decir, el contacto del polen y el óvulo cada uno de ellos producidos por una planta diferente.

- 5 La expresión "vigor de la planta" se utiliza en esta memoria en su sentido más amplio, refiriéndose a la resistencia general de la planta.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "cosecha de frutos" se refiere a la cosecha de una sola planta o, preferiblemente, a la cosecha de frutos obtenidos a partir de plantas de pimiento cultivadas a escala comercial.

- 10 La expresión "línea o variedad de pimiento comercial", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una planta de pimiento que está disponible comercialmente tal como, por ejemplo, la variedad de pimiento con un fruto dulce, comestible con un pericarpio grueso. Típicamente, la variedad de pimiento comercial puede tener fruto con una forma del fruto blocky, de tipo California. Ejemplos de variedades de pimiento comerciales incluyen, pero sin limitarse a, por ejemplo, cultivares comerciales de pimiento dulce del tipo "bell" (campana) tal como Cannon (Zeraim Gedera); Vergasa (Syngenta Seeds); Bardenas (Syngenta Seeds), Roxy (Syngenta Seeds), Yolo Wonder (Syngenta Seeds), etc.

"Baja temperatura" con respecto al crecimiento de la planta de pimiento de acuerdo con la presente invención se refiere a la temperatura en el intervalo de 10°-12°C y por debajo, dependiendo de la variedad utilizada.

- 20 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "alelo o alelos" significa cualquiera de una o más formas alternativas o formas variantes de diversas unidades genéticas idénticas o asociadas con las diferentes formas de un gen o de cualquier tipo de elemento genético identificable, todos cuyos alelos se refieren a al menos un rasgo o característica. En una célula diploide, los dos alelos de un gen dado ocupan correspondientes loci en un par de cromosomas homólogos y son, por lo tanto, alternativos en la herencia.

- 25 Tales formas alternativas o variantes pueden ser el resultado de un solo polimorfismo de nucleótidos, inserciones, inversiones, translocaciones o deleciones, o la consecuencia de la regulación génica causada, por ejemplo, por modificación química o estructural, regulación de la transcripción o modificación/regulación post-traducción.

- 30 En algunos casos puede ser más preciso referirse a "haplotipo" (es decir, un haplotipo es una combinación de alelos de varios o múltiples loci enlazados (en el mismo cromosoma) que se transmiten juntos) en lugar de "alelo", sin embargo, en esos casos, el término "alelo" debe entenderse que comprende el término "haplotipo". Los alelos se consideran idénticos cuando expresan un fenotipo similar, pero en algunos casos puede suceder que diferentes alelos también expresen un fenotipo similar. Son posibles diferencias en la secuencia, pero de menor importancia en tanto no influyan en el fenotipo.

- 35 Un alelo asociado con un rasgo cuantitativo puede comprender formas alternativas o variantes de diversas unidades genéticas incluyendo las que son idénticas o están asociadas a un solo gen o a múltiples genes o a sus productos o incluso una disrupción del gen o controlado por un factor genético que contribuye en el fenotipo representado por dicho QTL.

- 40 Un "determinante genético" se define aquí como una secuencia de nucleótidos, preferiblemente una secuencia de ADN que puede comprender secuencias genómicas con diversas funciones, tales como genes y regiones de elementos reguladores. Determinante genético también puede referirse a un constructo de nucleótidos y puede estar comprendido en un vector. Alternativamente, un determinante genético puede ser transferido de una planta a otra por recombinación cromosómica después de cruzar dichas plantas. Un determinante genético puede comprender, en principio, material genético procedente de una o más especies.

En particular, determinante genético, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un solo gen o a múltiples genes, un QTL o un haplotipo, que determina la expresión del fenotipo sin semillas en una planta de pimiento.

- 45 Un "gen" se define en esta memoria como una unidad hereditaria que consiste en una secuencia de ADN que ocupa una ubicación específica en un cromosoma y que contiene la instrucción genética para una característica o rasgo particular en un organismo.

Un "locus" se define en esta memoria como la posición en un mapa genético que ocupa un determinado gen o cualquier otro elemento genético o factor que contribuye en un rasgo en un cromosoma de una especie dada.

- 5 Tal como se utiliza en esta memoria, la frase "individuo diploide" se refiere a un individuo que tiene dos juegos de cromosomas, típicamente uno de cada uno de sus dos padres. Sin embargo, se entiende que en algunas realizaciones un individuo diploide puede recibir sus conjuntos de cromosomas "maternos" y "paternos" del mismo organismo solo, tal como cuando una planta se autofecunda para producir una posterior generación de plantas.

El término "cromosoma" se entiende que incluye, por lo que se utiliza aquí como sinónimo de las expresiones "grupo de enlace" y/o "equivalente cromosoma del grupo de enlace", respectivamente.

- 10 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "heterocigoto" significa una condición genética existente cuando diferentes alelos residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "homocigoto" significa una condición genética existente cuando alelos idénticos residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos. Homocigosis se define como ausencia de segregación después de la autofecundación de una planta individual o, si es cruzada, la ausencia de segregación en F₁.

- 15 Tal como se utiliza en esta memoria, el término/expresión "híbrido", "planta híbrida" y "progenie híbrida" se refiere a un individuo producido a partir parentales genéticamente diferentes o distintos (p. ej., un individuo genéticamente heterocigoto o mayormente heterocigoto) (Rieger et al, 1968).

Tal como se utiliza en esta memoria, la frase "híbrido F₁ de un solo cruce" se refiere a un híbrido F₁ producido a partir de un cruce entre dos líneas puras.

- 20 Tal como se utiliza en esta memoria, la frase "línea endogámica " se refiere a una población genéticamente homocigota o casi homocigota. Una línea endogámica, por ejemplo, se puede derivar a través de varios ciclos de cruces hermano/hermana o de autofecundación o en la producción de dihaploides. En algunas realizaciones, las líneas endogámicas se cultivan para uno o más rasgos fenotípicos de interés. Un "endogámico", "individuo endogámico", o "progenie endogámica" es un individuo muestreado de una línea endogámica.

- 25 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "línea dihaploide", se refiere a una línea endogámica estable producida por cultivo de anteras. Algunos granos de polen (haploides) cultivados en el medio y las circunstancias específicas pueden desarrollar plántulas que contienen n cromosomas. Estas plántulas son luego "duplicadas" y contienen cromosomas 2n. La progenie de estas plántulas se denomina "dihaploide" y son esencialmente ya no segregantes (estables).

- 30 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "progenie" se refiere a la o las descendencias de un cruce particular. Típicamente, la progenie resulta de la cría de dos individuos, aunque algunas especies (en particular algunas plantas y animales hermafroditas) pueden ser autofecundados (es decir, la misma planta actúa como el donante de gametos tanto masculinos como femeninos). El o los descendientes pueden ser, por ejemplo, de F₁, F₂, o cualquier otra generación posterior,

- 35 Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "introgresión", "introgresado" e "introgresar" se refieren al proceso mediante el cual genes, un QTL o haplotipo de una especie, variedad o cultivar se introducen en el genoma de otra especie, variedad o cultivar, por cruzamiento de esas especies. El cruce puede ser natural o artificial. El proceso puede ser completado opcionalmente por retrocruzamiento con el parental recurrente, en cuyo caso introgresión se refiere a la infiltración de los genes de una especie en la agrupación de genes de otra a través de retrocruzamiento repetido de un híbrido interespecífico con uno de sus parentales. Una introgresión también se puede describir como
- 40 un material genético heterólogo integrado de forma estable en el genoma de una planta receptora.

- "Ingeniería genética", "transformación" y "modificación genética" se utilizan todos en esta memoria como sinónimos para la transferencia de cualquier tipo de información genética en el ADN de la planta diana, habitualmente, pero no exclusivamente el ADN cromosómico o genoma, de otro organismo. La ingeniería genética es un método de integrar
- 45 de forma estable material genético heterólogo en el genoma de una planta receptora y puede incluir un procedimiento que comprende la transformación de células o tejido de una planta con un ADN recombinante que contiene un ADN heterólogo que incluye una secuencia de nucleótidos extraños que codifica una variante génica o

alélica de los mismos, así como los elementos reguladores seleccionados entre aquellos que son capaces de provocar la integración estable de ADN heterólogo en células de plantas o tejidos y de permitir la expresión de secuencias de nucleótidos extrañas en células vegetales o tejido vegetal.

Tal como se utiliza en esta memoria, la frase "marcador genético o molecular" se refiere a una característica del genoma de un individuo (p. ej., un nucleótido o una secuencia de polinucleótidos que está presente en el genoma de un individuo) que está asociado 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, los polimorfismos de nucleótido sencillos (SNPs), indeles (es decir, inserciones/deleciones), repeticiones de secuencias simples (SSRs), polimorfismos de restricción de longitud de fragmentos (RFLPs), ADNs polimórficos amplificados al azar (RAPDs), marcadores de secuencias polimórficas amplificadas escindidas (CAPS) marcadores de la Tecnología de Matrices de Diversidad (DArT) y polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), entre muchos otros ejemplos. Los marcadores genéticos pueden utilizarse, por ejemplo, para localizar loci genéticos que contienen alelos en un cromosoma que contribuyen a la variabilidad de los rasgos fenotípicos. La frase "marcador genético" también puede referirse a una secuencia de polinucleótidos complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico utilizado como sondas.

Un marcador genético o molecular puede estar localizado 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 se emplean típicamente cuando no se ha identificado la ubicación en un cromosoma del gen o de una mutación funcional, p. ej., dentro de un elemento de control fuera de un gen, que se corresponde con el locus de interés, y hay una muy baja tasa de recombinación entre el marcador genético y el locus de interés, la materia objeto aquí descrita también puede emplear marcadores genéticos que están físicamente dentro de los límites de un locus genético (p. ej., dentro de una secuencia genómica que corresponde a un gen tal como, pero no limitado a un polimorfismo dentro de un intrón o un exón de un gen). En algunas realizaciones de la materia objeto descrito en esta memoria, el uno o más marcadores genéticos comprenden entre uno y diez marcadores, y en algunas realizaciones los uno o más marcadores genéticos comprenden más de diez marcadores genéticos.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción" o "RFLP" significa una variación entre los individuos en los tamaños de los fragmentos de ADN cortados por enzimas de restricción específicas. Secuencias polimórficas que resultan en RFLPs se utilizan como marcadores en los mapas genéticos de ligamiento.

"Selección basada en marcadores" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a, p. ej., el uso de marcadores genéticos para detectar uno o más ácidos nucleicos de la planta, en que el ácido nucleico está asociado con un rasgo deseado para identificar las plantas que portan genes, QTL o haplotipo de rasgos deseables (o indeseables), de modo que esas plantas se pueden utilizar (o evitar) en un programa de cría selectiva.

"Microsatélites o Marcadores SSRs (Repeticiones de secuencias simples)" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a un tipo de marcador genético que consiste en numerosas repeticiones de secuencias cortas de bases de ADN, que se encuentran en loci en todo el genoma de la planta y tienen una probabilidad de ser altamente polimórficos,

Un "polimorfismo de nucleótido único" (SNP) es una variación de la secuencia de ADN que ocurre cuando un solo nucleótido, A, C, G, T en el genoma (u otras secuencias compartidas como ADN mitocondrial) difiere entre un conjunto de cromosomas (pareados) de un individuo o difiere entre miembros de una especie.

"PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)" se entiende dentro del alcance de la invención para aludir a un método para producir cantidades relativamente grandes de regiones específicas de ADN o subconjunto(s) del genoma, haciendo posible con ello diversos análisis que se basan en esas regiones.

"Cebador de PCR" se entiende dentro del alcance de la invención para aludir a fragmentos relativamente cortos de ADN monocatenario utilizado en la amplificación por PCR de regiones específicas del ADN.

"Polimorfismo" se entiende dentro del alcance de la invención para aludir a la presencia en una población de dos o más formas diferentes de un gen, marcador genético, o rasgo heredado o un producto génico que se puede obtener, por ejemplo, a través de corte y empalme alternativo, metilación del ADN, etc.

5 "Cultivo selectivo" se entiende dentro del alcance de la invención para aludir a un programa de cultivo que utiliza plantas que poseen o exhiben rasgos deseables como parentales.

Planta de "ensayo" se entiende para aludir a una planta del género *Capsicum* utilizada para caracterizar genéticamente un rasgo en una planta a ser sometida a ensayo. Típicamente, la planta a ensayar se cruza con una planta de "ensayo" y se puntúa la relación de segregación de la característica en la progenie del cruce.

10 "Sonda", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un grupo de átomos o moléculas que es capaz de reconocer y unirse a una molécula diana específica o estructura celular y, por lo tanto, de permitir la detección de la molécula o estructura diana. En particular, "sonda" se refiere a una secuencia de ADN o ARN marcado que se puede utilizar para detectar la presencia de y cuantificar una secuencia complementaria por hibridación molecular.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "población" significa una colección genéticamente homogénea o heterogénea de plantas que comparten una derivación genética común.

15 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "variedad" o "cultivar" significa un grupo de plantas similares que por las características estructurales y el rendimiento pueden ser identificadas de otras variedades de la misma especie. El término "variedad", tal como se utiliza en esta memoria, tiene un significado idéntico a la definición correspondiente en el Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (tratado UPOV) de 2 de diciembre de 1961, revisado en Ginebra el 10 de noviembre de 1972, el 23 de octubre de 1978 y el 19 de marzo de 1991. Por lo tanto, "variedad" significa un conjunto de plantas de un solo taxón botánico del rango más bajo conocido que, con independencia de que se cumplan plenamente las condiciones para la concesión del derecho de obtentor, pueda i) definirse por la expresión de los caracteres resultantes de un genotipo o combinación de genotipos dados, ii) distinguirse de cualquier otro conjunto de plantas por la expresión de al menos uno de dichos caracteres y iii) considerarse como una unidad, con respecto a su aptitud a propagarse sin alteración.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "pimiento" o "*Capsicum*" significa cualquier especie, variedad, cultivar o población del género *Capsicum*.

Una planta "*Capsicum* cultivada" se entiende dentro del alcance de la invención para aludir a una planta que ya no está en el estado natural, pero que ha sido desarrollada por el cuidado humano y para el uso y/o consumo humano.

30 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "cultivo" y variantes gramaticales del mismo, se refiere a cualquier proceso que genera un individuo de progenie. Los cultivos pueden ser sexuales o asexuales, o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de tipos no limitativos de cultivos incluyen cruces, autofecundaciones, generación derivada de haploides duplicada y combinaciones de los mismos.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, la frase "población de cultivo establecida" se refiere a un conjunto de potenciales participantes en el cultivo producidos por y/o utilizados como parentales en un programa de cultivo; p. ej., un programa de cultivo comercial. Los miembros de la población de cultivo establecido están bien caracterizados genética y/o fenotípicamente. Por ejemplo, varios rasgos fenotípicos de interés podrían haber sido evaluados, p. ej., en diferentes condiciones ambientales, en múltiples lugares, y/o en momentos diferentes. Alternativamente, o además, podrían haber sido identificados uno o más loci genéticos asociados con la expresión de los rasgos fenotípicos y uno o más de los miembros de la población de cultivo podría haber sido genotipado con respecto a uno o más loci genéticos, así como con respecto a uno o más marcadores genéticos que están asociados con el uno o más loci genéticos.

"Retrocruzamiento" se entiende para referirse a un proceso en el que una progenie híbrida se cruza varias veces de nuevo a uno de los parentales. En retrocruzamientos sucesivos se pueden utilizar diferentes parentales recurrentes.

45 La siguiente descripción se proporciona, junto con todos los capítulos de la presente invención, a fin de permitir a cualquier persona experta en la técnica hacer uso de dicha invención. Diversas modificaciones, sin embargo, resultarán evidentes para los expertos en la técnica, ya que los principios genéricos de la presente invención se han

definido específicamente para proporcionar un pimiento sin semilla estéril macho con características únicas tal como se expone a continuación.

En el proceso de la producción de semillas híbridas endógamos estériles machos se utilizan habitualmente como la línea parental femenina con el fin de aumentar la eficiencia de la producción de híbridos. Plantas de pimiento estériles crecen muy altas y muy rápidamente. En la parte superior de la planta, fructificaron muy pequeños frutos sin semillas, deformados. La pulverización de hormonas sobre este tipo de plantas no ha tenido éxito en la inducción de una fructificación "normal". Sin embargo, como en muchos rasgos del pimiento existe una variación genética a este fenómeno. Líneas estériles machos difieren en la cantidad y calidad de sus pimientos sin semillas.

Dentro del alcance de la presente invención se descubrieron líneas de pimiento que eran capaces de dar frutos sin semillas de alto rendimiento cualitativo, particularmente frutos que no mostraron deformaciones. Deformación en este contexto significa que un fruto muestra una forma irregular y no usual, p. ej., no es uniforme, no es simétrico o es irregular o no muestra segmentaciones.

El tamaño de un fruto SLP puede ser menor que el de un fruto normal, portador de semillas, si se compara en un fondo genético por lo demás idéntico. El hermano portador de semillas puede ser hasta 5 veces mayor que su pariente SLP. Sin embargo, es posible mediante el cruce en diferentes fondos genéticos compensar este tamaño más pequeño y obtener frutos de pimiento sin semillas que tengan el mismo o esencialmente el mismo tamaño que un tamaño comercial del fruto de pimiento dulce.

En particular, el fruto SLP en la madurez puede pesar entre 2 gramos y 10 gramos, particularmente entre 2,5 g y 5 g, o tiene un tamaño de 1 cm a 4 cm, particularmente de 1,5 cm a 3 cm por 0,5 cm a 5 cm, particularmente por 2 cm a 4 cm de diámetro.

El rasgo "sin semillas" está bajo el control de un determinante genético y se expresa de forma permanente en las plantas de pimiento de acuerdo con la presente invención independientemente del tratamiento artificial con agentes inductores tales como, por ejemplo, hormonas vegetales o extractos vegetales, que se utilizan comúnmente en el cultivo del pimiento protegido en el invernadero para inducir artificialmente la partenocarpia en el pimiento. La expresión del rasgo "sin semillas" en las plantas de acuerdo con la invención es también en gran medida independiente de otros factores exógenos, incluyendo el proceso de polinización o la fecundación, las condiciones climáticas o variabilidades estacionales.

Como resultado, las plantas de acuerdo con la presente invención muestran una excelente fructificación en todas las estaciones, es decir, también en condiciones de crecimiento desfavorables, como las presentes en la temporada de invierno en la región de Arava en Israel (clima mediterráneo), en donde la temperatura media promedio está en el intervalo de entre 4°C y 14°C, en particular entre 6°C y 12°C.

En una realización de la invención, se desarrolló una planta de pimiento sin semillas estéril (SLP) masculina que se caracteriza por su capacidad de dar frutos sin semillas en toda la planta. Los frutos son de un tamaño pequeño de modo que, por lo general, se pueden consumir en un solo bocado.

En particular, la línea aislada de planta de pimiento sin semillas estéril masculina exhibe rasgos característicos que incluyen los seleccionados del grupo formado por (i) excelente fructificación en todas las estaciones; (ii) planta fuerte y resistente; (iii) débil dominancia apical en comparación con pimientos no estériles que resultan en muchas ramas laterales y ramificaciones de las ramas; (iv) tendencia a dar dos frutos por nudo en aproximadamente el 20% de los nudos; (v) tamaño y forma bastante uniformes; (vi) intervalos cortos entre nudos, aprox. de 10 cm de largo; (vii), la producción de frutos comienza a partir de los primeros nudos y progresa a lo largo de la longitud de las ramas, de manera similar a las plantas no estériles; y (viii) la flor tiene pequeñas anteras sin polen.

Además, los frutos de pimiento que crecen en dicha línea aislada de plantas exhibe rasgos característicos que incluyen los seleccionados del grupo que consiste en (i) frutos sin semillas; (ii) pigmentación roja en frutos maduros y verde en frutos pre-maduros (inmaduros); (iii) forma tipo cónica, es decir, entre campana y cónica clásica; (iv) tamaño entre aproximadamente 2 y 4 cm de largo por aproximadamente 3 a 4 cm de diámetro; y (v) sabor muy dulce (Brix aproximadamente 8 a aproximadamente 11°).

La presente invención proporciona evidencia experimental que sugiere que el rasgo "sin semillas" mostrado por las plantas de esta invención está controlado genéticamente. En particular, parece que el rasgo "sin semillas" es

multigénico y facultativo. Cuando estas plantas y variedades son polinizadas, ya sea por insectos o manualmente, la fructificación y el desarrollo se producen normalmente. Sin embargo, bajo condiciones en las que la polinización es difícil o no se produce, estas plantas y variedades, no obstante, dan fruto que se desarrolla con normalidad, mientras que las plantas y variedades convencionales de la técnica anterior podrían no dar fruto en absoluto, o darían fruto, pero a menudo se deforma y/o inmediatamente comienza a pudrirse desde el extremo de la flor, y el desarrollo de la fruto es pobre en el mejor de los casos, siendo finalmente superado por la putrefacción que prosigue desde el extremo de la flor.

El rasgo "sin semillas" puede ser introgresado en cualquier otra planta o línea de planta del género *Capsicum*, mediante un método seleccionado del grupo que consiste en el cultivo, la conversión y la transformación del rasgo único. En particular, el rasgo "sin semillas" puede ser introgresado en líneas y variedades de pimiento comerciales por métodos conocidos por los expertos en la técnica del cultivo de plantas.

Pimientos comerciales son generalmente híbridos producidos por el cruce de dos líneas parentales (endogamias). El desarrollo de híbridos requiere, en general, el desarrollo de líneas endogámicas homocigóticas, el cruce de estas líneas y la evaluación de los cruces.

El cultivo de selección y métodos de cultivo de selección recurrentes se utilizan para desarrollar las líneas endogámicas de las poblaciones de cultivo. Los programas de endogamia combinan las bases genéticas a partir de dos o más líneas endogámicas o diversas otras fuentes de germoplasma en agrupaciones de cultivo a partir de la que las nuevas líneas endogámicas se desarrollan por autofecundación y selección de fenotipos deseados. Las nuevas líneas endogámicas se cruzan con otras líneas endogámicas y los híbridos de estos cruces son evaluados para determinar cuáles de ellos tiene un potencial comercial. El cultivo de plantas y el desarrollo de híbridos son procesos costosos y laboriosos.

El cultivo de selección comienza con el cruce de dos genotipos, cada uno de los cuales puede tener una o más características deseables que faltan en la otra o que complementan a la otra. Si los dos parentales originales no proporcionan todas las características deseadas, se pueden incluir otras fuentes en la población de cultivo. En el método de selección, las plantas superiores se autofecundan y se seleccionan en generaciones sucesivas. En las generaciones venideras la condición heterocigótica da paso a líneas homogéneas como resultado de la autopolinización y selección. Típicamente, en el método de selección del cultivo se ponen en práctica cinco o más generaciones de autofecundación y selección: F1 a F2; F3 a F4; F4 a F5, etc. Resulta un híbrido de un solo cruce del cruce de dos líneas endogámicas, cada una de las cuales tiene un genotipo que complementa el genotipo de la otra. La progenie híbrida de la primera generación se designa F1. En el desarrollo de híbridos comerciales se buscan solamente las plantas híbridas F1. Híbridos F1 preferidos son más vigorosos que sus parentales endogámicos. Este rendimiento híbrido (vigor híbrido o heterosis), se puede manifestar en muchos rasgos poligénicos, incluyendo el aumento del crecimiento vegetativo y aumento del rendimiento. El cultivo en pimientos se puede acelerar mediante el uso de haploides dobles obtenidos por cultivo de anteras. Esta técnica ofrece la posibilidad de asegurar el proceso mediante la producción de líneas puras en un período de tiempo más corto que el proceso regular del cultivo de selección. Plantas del género *Capsicum* pueden ser fácilmente polinizadas de forma cruzada. Un rasgo también se transfiere fácilmente de una planta de pimiento a otra planta, incluyendo plantas de pimiento de diferentes tipos usando técnicas convencionales de cultivo, por ejemplo, para obtener líneas comerciales adicionales. La introgresión de un rasgo en la línea de élite se consigue, por ejemplo, por el cultivo de selección recurrente, por ejemplo, por retrocruzamiento. En este caso, la línea de élite (parental recurrente) se cruza primero a un donante endogámico (el parental no recurrente) que porta el rasgo, particularmente el rasgo "sin semillas" de acuerdo con la presente invención. La progenie de este cruce se aparea entonces de nuevo con el progenitor recurrente seguido por la selección en la progenie resultante para el rasgo. Después de tres, preferiblemente cuatro, más preferiblemente cinco o más generaciones de retrocruzamientos con el parental recurrente con la selección para el rasgo, particularmente el rasgo "sin semillas", de acuerdo con la presente invención, la progenie es heterocigótica para el locus que alberga la resistencia, pero es como el parental recurrente para la mayoría o casi todos los otros genes (véase, por ejemplo, Poehliman y Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4ª Ed, 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique).

La selección para el rasgo se lleva a cabo después de cada uno de los cruces. La esterilidad masculina está disponible en la pimiento. En particular, la esterilidad masculina genética es ampliamente utilizada en líneas comerciales, p. ej., líneas de pimiento dulce (véase, por ejemplo Daskatoff S. (1972), mientras que en el pimiento de chile picante también se utiliza la esterilidad masculina citoplasmática (Peterson, 1958). Mutantes de pimiento estériles masculinos y su utilización en el cultivo de heterosis. Eucarpia, meetings on genetic and breedings. Turín 1971, 205-210).

En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de producción de una planta de pimiento sin semillas que comprende las etapas de

- i) proporcionar semillas de una línea endogámica de un híbrido F1 de una planta de pimiento sin semillas que es macho estéril como línea hembra y una planta de pimiento (portadora de semillas) macho fértil como línea macho;
- ii) germinar dicha semilla y cultivar una planta fértil, madura a partir de ella;
- iii) inducir la autopolinización de dicha planta cultivada en (ii), cultivar frutos y recolectar las semillas fértiles a partir de ellos, y
- iv) cultivar plantas a partir de las semillas recolectadas en iii) y, opcionalmente seleccionar plantas en las que crecen frutos sin semillas.

El pimiento es una especie auto-polinada, por lo que normalmente una planta puede ser fácilmente reconocida como sin semillas solo si también es estéril. En teoría, estos 2 fenómenos no están interconectados entre sí, en el sentido de estar vinculados genéticamente, pero en la práctica, la partenocarpia pueden ser fácilmente identificada cuando la planta tiene las 2 rasgos juntos. El uso de plantas fértiles requeriría cortar y abrir el fruto para determinar si las semillas están presentes o no.

En un aspecto de la invención, las plantas que expresan el rasgo "sin semillas" y, por lo tanto, desarrollan frutos de pimiento sin semillas, pueden ser identificadas y seleccionadas mediante una simple observación visual de las flores y la identificación de individuos estériles masculinos. Después de distinguir las plantas estériles, éstas se vuelven a plantar y se estima para su capacidad de dar frutos sin semillas. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante el examen de la planta por las siguientes características fenotípicas:

1. La fructificación se ha iniciado en los primeros nudos, como en plantas fértiles.
2. La fructificación se produce independientemente del proceso de polinización y/o fecundación en todas las estaciones del año, cuando también fructifican normalmente plantas fértiles.
3. La fructificación se produce independientemente del proceso de polinización y/o fecundación en condiciones desfavorables.

En la alternativa, se puede emplear el cultivo asistido por marcadores para identificar a los individuos en donde loci relevantes para la invención y/o loci marcadores flanqueantes o loci marcadores genéticamente vinculados a los mismos tienen genotipos favorables, particularmente genotipos homocigotos favorables.

Por lo tanto, los marcadores se pueden desarrollar mediante métodos conocidos por la persona experta y se pueden utilizar para identificar y seleccionar plantas de acuerdo con la presente invención y tal como se describe antes en esta memoria, con un alelo o un conjunto de alelos de locus o loci que representan el rasgo sin semillas.

Existen varios métodos o enfoques disponibles, conocidos por los expertos en la técnica, que pueden ser utilizados para identificar y/o desarrollar marcadores en desequilibrio de vinculación y/o vinculados a y/o localizados en la región de genoma donde residen el gen o los genes, QTL o haplotipo para el rasgo sin semillas, así como marcadores que representan las mutaciones causales reales subyacentes el rasgo sin semillas. Sin ser totalmente exhaustivos algunos enfoques, conocidos por los expertos en la técnica, incluyen:

- *enfoque de genes candidatos*; secuencias de genes candidatos o secuencias vinculadas a genes candidatos se pueden rastrear en cuanto a polimorfismo asociado y/o genéticamente relacionado con el rasgo de interés y una vez asociados y/o genéticamente vinculados esos polimorfismos se pueden utilizar en aplicaciones de cultivo asistido por marcadores.

- *enfoque de análisis segregante a granel (BSA) (Michelmore et al., 1991)*; después de fenotipar una población, las plantas (por lo general entre 5-40) con fenotipos contrastantes del rasgo de interés se agrupan, con los grupos que forman masas que representan los extremos terminales fenotípicos de la población. A continuación, las masas se ensayan para determinar la presencia o ausencia de alelos de marcadores moleculares. Puesto que se supone que

las masas contrastan para los alelos que contribuyen a los extremos terminales fenotípicos, cualquier polimorfo marcador entre las masas es un candidato marcador genéticamente vinculado, p. ej., vinculado a la característica de interés y puede utilizarse en aplicaciones de cultivo asistidas por marcadores o, alternativamente, se puede utilizar para mapear genéticamente el rasgo de interés.

- 5 - *enfoque de mapeo de QTL o mapeo de asociación*: una población de un panel de plantas puede ser caracterizado para el rasgo de interés (fenotipado) y genotipado utilizando marcadores de preferencia muy bien distribuidos por todo el genoma. Después de los datos de genotipo y de los datos fenotipo obtenidos se buscaron patrones de asociación entre los datos de genotipo y los datos de fenotipo mediante análisis de datos de genotipo y de fenotipo
10 de interés se puede utilizar posteriormente en aplicaciones de cultivo asistido por marcadores.

Después del mapeo de QTL y/o el mapeo de asociación, o después del mapeo genético de los marcadores vinculados con el rasgo de interés, otros marcadores o genes que se sabe que se encuentran en la misma región genómica (y por lo tanto están vinculados genéticamente) pueden ser identificados y utilizados para desarrollar marcadores adicionales en la región de interés y/o se pueden utilizar en aplicaciones de cultivo asistidas por marcadores.
15

Marcadores o secuencias de marcadores genéticamente vinculados también se pueden utilizar para aislar otras secuencias de ácidos nucleicos que flanquean los marcadores por enfoques de hibridación, PCR y/o 'in-silico'. Esas secuencias de ácidos nucleicos flanqueantes se pueden utilizar para buscar nuevos y/o polimorfismos adicionales asociados y/o genéticamente vinculados con el rasgo de interés que también se puede utilizar en poblaciones de cultivo asistido por marcadores.
20

Secuencias de ácido nucleico asociadas y/o genéticamente vinculadas con el rasgo de interés también se pueden utilizar en enfoques de genoma comparativo y/o mapeo de sentina para identificar región o regiones homólogas y secuencias homólogas y/o ortólogas y/o genes candidatos.

En un aspecto, la presente divulgación por lo tanto se refiere a un marcador genético que está ligado genéticamente al determinante genético que controla el rasgo "sin semillas" en una planta de pimiento de acuerdo con la invención, particularmente una planta de pimiento híbrida designada *Capsicum annuum* AR07-F1-56-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-87-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-166-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-171-X; y *Capsicum annuum* AR07-F1-172-X, cultivadas de semillas depositadas en NCIMB, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, Reino Unido el 26 de mayo de 2008, con el número de acceso NCIMB 41558, NCIMB 41559, NCIMB 41560, NCIMB 41561 y NCIMB 41562, respectivamente, o una progenie F2 de las mismas. Este marcador genético puede ser cualquier marcador seleccionado del grupo que consiste, pero no está limitado a, polimorfismos de restricción de longitud de fragmentos (RFLP), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción amplificados (AFLP), repeticiones de secuencia sencilla (SSR) y polimorfismos de nucleótido único SNP o cualquier secuencia de ácido nucleico asociada y/o ligada genéticamente con el rasgo "sin semillas".
25
30

La presente divulgación también se refiere a un método de desarrollo de dicho marcador que incluye los descritos anteriormente en esta memoria, particularmente un marcador que está ligado genéticamente al determinante genético que controla el rasgo "sin semillas" en una planta de pimiento híbrida designada *Capsicum annuum* AR07-F1-56-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-87-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-166-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-171-X; and *Capsicum annuum* AR07-F1-172-X, cultivadas a partir de semillas depositadas en NCIMB, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, Reino Unido el 26 de mayo de 2008 con el número de acceso NCIMB 41558, NCIMB 41559, NCIMB 41560, NCIMB 41561 y NCIMB 41562, respectivamente, o una progenie F2 de las mismas.
35
40

También se divulga el uso de dicho marcador para identificar otros marcadores o genes de los que se sabe que están ubicados en la misma región genómica (y por lo tanto ligados genéticamente) y para desarrollar marcadores adicionales en la región de interés y/o en aplicaciones de cultivo asistidas por marcador.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a una planta de pimiento sin semillas que comprende dicho marcador que está ligado genéticamente al determinante genético que controla el rasgo "sin semillas" en dicha planta de pimiento, particularmente un marcador que se puede obtener a partir de una planta de pimiento híbrida designada *Capsicum annuum* AR07-F1-56-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-87-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-166-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-171-X; y *Capsicum annuum* AR07-F1-172-X, cultivadas a partir de semillas depositadas en NCIMB, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, Reino Unido el 26 de mayo de 2008 con el número de acceso NCIMB 41558, NCIMB 41559, NCIMB 41560, NCIMB 41561 y NCIMB 41562, respectivamente, o a partir de
45
50

una progenie F2 de las mismas, particularmente mediante la aplicación de un método como se divulga en esta memoria.

La selección basada en marcadores ya puede utilizarse en las primeras fases del desarrollo endogámico, a menudo en combinación con los métodos de cribado que se basan en gran medida en las características fenotípicas que se pueden determinar visualmente y están relacionadas con el rasgo de interés, es decir, el rasgo "sin semillas" y, además, a los índices de rendimiento clave tales como, por ejemplo, vigor de la planta, longitud de entrenudos, ramificaciones, resistencia a insectos, resistencias a virus tales como TMV (virus del mosaico del tabaco) y TSWV (virus del bronceado del tomate), etc., que son relevantes de la idoneidad de la planta para ser utilizado en la producción de híbridos comerciales. La selección también se puede basar en los marcadores moleculares, que pueden o no estar vinculados con los rasgos de interés.

En particular la selección, basada en marcadores puede ser aplicada en combinación con o a continuación de una selección fenotípica para identificar a aquellos individuos en donde todos los loci relevantes para la invención tienen genotipos favorables homocigotos o heterocigotos.

Existen varios tipos de marcadores moleculares que se pueden utilizar en la selección basada en marcadores, incluyendo, pero no limitados a, polimorfismos de restricción de longitud de fragmentos (RFLP), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción amplificados (AFLP), repeticiones de secuencia sencilla (SSR) y polimorfismos de nucleótido único SNPs.

RFLP implica el uso de enzimas de restricción para cortar el ADN cromosómico en sitios específicos de restricción cortos, los polimorfismos son el resultado de duplicaciones o deleciones entre los sitios o las mutaciones en los sitios de restricción.

RAPD utiliza la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de baja rigurosidad con cebadores individuales de secuencia arbitraria para generar matrices específicas de la cepa de fragmentos de ADN anónimo. El método requiere solo pequeñas muestras de ADN y analiza un gran número de loci polimórficos.

AFLP requiere la digestión del ADN celular con una enzima o enzimas de restricción antes de utilizar PCR y nucleótidos selectivos en los cebadores para amplificar fragmentos específicos. Con este método, utilizando técnicas de electroforesis para visualizar los fragmentos obtenidos, se pueden medir hasta 100 loci polimórficos por combinación de cebadores y solo se requiere una pequeña muestra de ADN para cada ensayo.

El análisis SSR está basado en secuencias de microsatélites de ADN (de repetición corta) que son ampliamente dispersadas por todo el genoma de los eucariotas, que se amplifican selectivamente para detectar variaciones en repeticiones de secuencias simples. Solo se requieren pequeñas muestras de ADN para un análisis SSR.

SNPs utilizan ensayos de extensión por PCR que recogen eficientemente mutaciones puntuales. El procedimiento requiere poco ADN por muestra. Uno o una combinación de los métodos anteriores se puede utilizar en un programa de cultivo de selección típico a base de marcadores.

Actualmente, el método más preferido para conseguir 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 Biol 51:263 273 (1986)), utilizando pares de cebadores que implican un cebador directo y un cebador inverso que son capaces de hibridarse a las secuencias proximales que definen un polimorfismo en su forma de doble cadena.

Básicamente, el método de la amplificación por PCR implica el uso de un cebador o un par de cebadores que comprenden dos secuencias cortas de cebadores de oligonucleótidos que flanquean el segmento de ADN a amplificar o las 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 hibridados con ADN polimerasa. Los cebadores se hibridan a cadenas opuestas de las secuencias diana de ADN. La hibridación se refiere a la reasociación de cadenas de ADN complementarias, en donde complementarias se refiere a la secuencia de los nucleótidos de modo que los nucleótidos de una cadena se pueden unir con los nucleótidos en la cadena opuesta para formar estructuras de doble cadena. Los cebadores están orientados de manera que la síntesis de ADN por parte de la polimerasa procede bidireccionalmente a través de la secuencia de nucleótidos entre los cebadores. Este procedimiento duplica

efectivamente la cantidad de ese segmento de ADN en un ciclo. Debido a que los productos de PCR son complementarios a, y son capaces de unirse a, los cebadores, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad de ADN sintetizado en el ciclo anterior. El resultado de este procedimiento es la acumulación exponencial de un fragmento diana específico, que es aproximadamente 2^n , en donde n es el número de ciclos.

- 5 A través de la amplificación por PCR se hacen millones de copias del segmento de ADN flanqueadas por los cebadores. Las diferencias en el número de secuencias o inserciones o deleciones repetidas, que se encuentran entre los cebadores flanqueantes en diferentes alelos se reflejan en las variaciones de longitud de los fragmentos de ADN amplificados. Estas variaciones pueden ser detectadas, por ejemplo, mediante la separación electroforética de los fragmentos de ADN amplificados en geles o mediante el uso de un secuenciador capilar. Mediante el análisis del gel o perfil, se puede determinar si la planta contiene el alelo deseado en un estado homocigótico o heterocigótico o si el alelo deseado o no deseado está ausente del genoma de la planta.

10 Variaciones de secuencia entre diferentes alelos que no conducen a una variación de la longitud, tales como SNPs se pueden determinar (genotipar) mediante una amplia gama de métodos de genotipado que podrían basarse en la hibridación, en enzimas, o por otros métodos post-amplificación basados en las propiedades físicas del ADN, así como por secuenciación.

15 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)), el cual utiliza dos pares de sondas de oligonucleótidos para amplificar exponencialmente una diana específica. Las secuencias de cada par de oligonucleótidos se seleccionan para permitir que el par se hibride con secuencias colindantes de la misma cadena de la diana. Una hibridación de este tipo forma un sustrato para una ligasa dependiente del molde. Al igual que con la PCR, los productos resultantes de este modo sirven como molde en ciclos posteriores y se obtiene una amplificación exponencial de la secuencia deseada.

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

25 Un método adicional que, alternativamente, se puede emplear es el "Ensayo de Ligadura 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 a tope con las secuencias de una sola cadena de una diana. OLA, al igual que LCR, es particularmente adecuado para la detección de mutaciones puntuales. A diferencia de LCR, sin embargo, OLA resulta en una amplificación "lineal" en lugar de exponencial de la secuencia diana.

30 Todavía otro método que, alternativamente, se puede emplear es el "Ensayo Invasor" que utiliza una etiqueta de endonucleasa específica para la estructura (FEN) para escindir un complejo tridimensional formado por la hibridación de oligonucleótidos solapantes específicos de alelo con el ADN diana que contiene un sitio de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). La reasociación del oligonucleótido complementario al alelo SNP en la molécula diana desencadena la escisión del oligonucleótido por cleavasa, una FEN termoestable. La escisión se puede detectar mediante 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 puede ser detectada 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 baja tasa de fracaso, y puede detectar cantidades zeptomolares de ADN diana. Mientras que el ensayo se ha utilizado tradicionalmente para interrogar a un SNP en una muestra por cada reacción, se han sometido a ensayo nuevos enfoques basados en chip o perlas para hacer este ensayo eficiente y preciso adaptable a la multiplexación y genotipado de SNP de alto rendimiento.

45 Nickerson et al. han descrito un ensayo de detección de ácidos nucleicos que combina atributos de PCR y OLA (Nickerson et al., Proc Natl Acad Sci (U.S.A.) 87:8923 8927 (1990)). En este método, se utiliza la PCR para conseguir la amplificación exponencial del ADN diana, que se detecta después 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 ser fácilmente adaptado a los propósitos de la presente invención.

5 Un marcador molecular puede ser por tanto un fragmento de ADN amplificado por PCR, p. ej., un marcador de SSR o un marcador RAPD. La presencia o ausencia de un fragmento de ADN amplificado puede ser indicativa de la presencia o ausencia del propio rasgo o de un alelo particular del rasgo. Cuando se utilizan marcadores de SSR, una diferencia en la longitud de un fragmento de ADN amplificado puede ser indicativa de la presencia de un alelo particular de un rasgo y, por lo tanto, permite distinguir entre diferentes alelos de un rasgo.

10 En un aspecto específico de la divulgación, marcadores de repeticiones de secuencia sencilla (SSR) se utilizan para identificar alelos relevantes para la invención en las plantas parentales y/o los ancestros de las mismas, así como en las plantas de la progenie resultantes de un cruce de dichas plantas parentales. Repeticiones de secuencia sencilla son secuencias cortas de ADN repetidas y están presentes en los genomas de todos los eucariotas y consisten en varias a más de cien repeticiones de un motivo de nucleótidos dado. Dado que el número de repeticiones presentes en una localización particular en el genoma a menudo difiere entre las plantas, las SSRs se pueden analizar para
15 determinar la ausencia o presencia de alelos específicos.

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

20 Análisis de marcadores se pueden hacer pronto en el desarrollo de la planta utilizando muestras de ADN extraídas de tejido foliar de plantas muy jóvenes o de semillas. Esto permite identificar las plantas con un deseable maquillaje genético en el ciclo de cultivo y descartar las plantas que no contengan los alelos relevantes de la invención deseados, antes de la polinización, reduciendo así el tamaño de la población de cultivo y la reducción de los requisitos de fenotipado.

25 Además, mediante el uso de marcadores moleculares, se puede hacer una distinción entre las plantas homocigotas que portan dos copias del alelo relevante de la invención deseado en loci relevantes de la invención y plantas heterocigotas que portan una sola copia y plantas que no contienen copia alguna del o de los alelos favorables.

Los marcadores moleculares pueden utilizarse en la selección asistida por marcadores y/o cualquier otro método en el que se rastrean las plantas que tienen o no tienen el rasgo "sin semillas". Los marcadores pueden ser tanto marcadores trans como cis. Un marcador trans indica un polimorfismo resultante de introgresión de ADN exógeno
30 (donante) en un genoma de una planta receptora, polimorfismo que está enlazado en cis con el genoma del receptor, es decir, está enlazado con el alelo opuesto. Por lo tanto, los marcadores cis están enlazados con el alelo de interés, mientras que los marcadores trans están enlazados con el alelo opuesto (del receptor).

Para determinar la utilidad de la línea endogámica y su potencial para contribuir genéticamente a la progenie híbrida se realiza un cruce de ensayo con otra línea endogámica, y la progenie resultante se evalúa fenotípicamente.
35 Rasgos que pueden registrarse comúnmente implican rasgos que se relacionan con la forma del fruto y características del fruto como el fruto puntiagudo o no puntiagudo, picante o no picante, rojo, amarillo o naranja. Características de la planta tales como la longitud de entrenudos, el poder de desarrollo y las ramificaciones también se consideran junto con las resistencias del virus específico tales como TMV (virus del mosaico del tabaco) y TSWV (virus del bronceado del tomate).

40 Para el genotipado o el mapeo de asociación el ADN se extrae de material vegetal adecuado tal como, por ejemplo, tejido de la hoja. En particular, se recogen masas de hojas de una pluralidad de plantas. Las muestras de ADN se genotipan utilizando una pluralidad de SSRs polimórficas, SNPs o cualquier otro tipo de marcador adecuado que cubra la totalidad del genoma de pimiento.

El análisis conjunto de los datos genotípicos y fenotípicos se puede realizar utilizando un software estándar.

45

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas. A la vista de la presente descripción y del nivel general de habilidad en la técnica, los expertos apreciarán que los siguientes Ejemplos pretenden ser solamente ilustrativos.

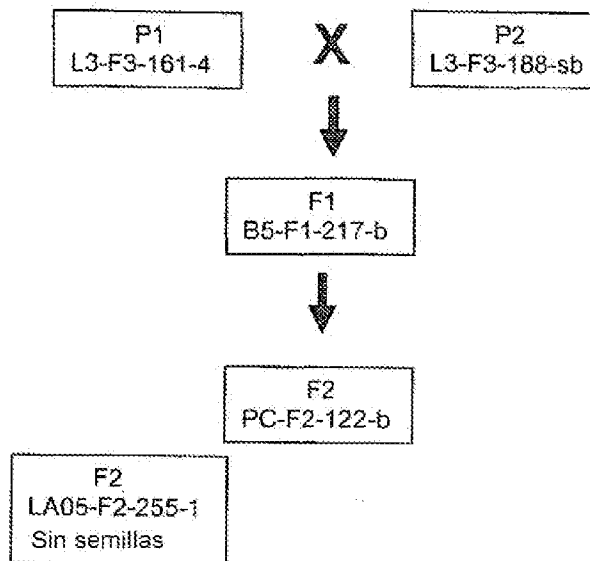
Ejemplo 1: Aislamiento de una línea de Pimiento Sin Semillas

- 5 1.1 *Crecimiento y Condiciones de Cultivo*: Los SLPs de la presente invención se cultivaron en Netiv HaHasara y Zofar (Israel) durante dos campañas de cultivo, es decir, la primavera y el verano de 2006; y el otoño y el invierno de 2006-2007. Como en la mayoría de las plantas, especialmente los pimientos, las características descritas están relacionadas con el crecimiento, las estaciones y las condiciones, se puede suponer que, bajo otras condiciones, las características de la planta sí pueden diferir. Se presenta el siguiente ejemplo:

- 10 Condiciones de Netiv HaHasara: invernadero cubierto de plástico sin calefacción, cubierto por una red de sombra (40%, a partir de mayo); suelo arenoso; siembra en febrero de 2006; 2,500 plantas por cada 1.000 m²; caña de soporte lateral de estilo español; no desmochado de frutos y plantas, como en la práctica comercial aceptada.

- 15 Condiciones de Zofar: Invernadero sin calefacción al tiempo que se utilizaban redes dobles, una red blanca (MALLA 25, 20% de sombra) a lo largo de la temporada y redes negras, 40% de sombra durante los primeros 40 días, y los dos últimos meses de la temporada de desarrollo (es decir, febrero y marzo), suelo arenoso; siembra en julio de 2006; 3.500 plantas por cada 1.000 m²; caña de soporte lateral de estilo español; no desmochado de frutos y plantas, como en la práctica comercial aceptada.

1.2 *Información de la selección*: La selección de una de esas plantas sin semilla es como se muestra en el esquema siguiente:



- 20 La fuente de P1 y P2 son semillas F2 de variedades comerciales cultivadas en el campo L3. La población de P2 (la parcela L3-188) se dividió por la esterilidad. P1 y P2 fueron seleccionados de acuerdo a sus fuertes plantas y bastante buena calidad. P1 se hizo a partir de semillas de una planta fértil, N° 4, en la parcela "L3-161" y P2 es una masa de las semillas de muchas plantas fértiles en la parcela L3-188. Ambos eran de tipo pimiento rojo. El híbrido "B5-F1-217-b" fue hecho por estas 2 plantas, en donde P1 era el parental masculino y P2 era el femenino. El híbrido fue cultivado (15 plantas) en el campo PC en la parcela 122, y las semillas F2 se obtuvieron de todas las plantas. Estas semillas F2 se sembraron en el campo L5 en la parcela 155. Esta población se dividió por la esterilidad. Entre muchas otras plantas estériles, la planta número 1 se distinguió por su capacidad de dar pequeños frutos sin semillas a lo largo de la planta. La planta se multiplicó vegetativamente y la progenie se cultivó en la temporada de otoño-invierno. En esta temporada el rendimiento de estas plantas era muy similar a la de primavera-verano
- 25
- 30

- 5 **1.3 Características de la Planta y el Fruto:** Los experimentos proporcionan frutos y plantas (Véanse las fotografías 1 y 2), que se definen por lo siguiente: frutos sin semillas caracterizados por (i) sin semilla; (ii) Pigmentado de rojo en maduro y pigmentado verde oscuro en frutos pre-maduros (inmaduros); (iii) forma tipo cónica, es decir, entre campana y cónica clásica; (iv) tamaño entre aproximadamente 2 y 4 cm de largo por aproximadamente 3 a 4 cm de diámetro; y (v) sabor muy dulce (Brix aproximadamente 8 a aproximadamente 11°). La planta sin semillas se caracteriza por características seleccionadas de un grupo que comprende, entre otros, (i) excelente fructificación en todas las estaciones; (ii) planta fuerte y resistente; (iii) muchas ramas laterales, ramificaciones de las ramas, débil dominancia apical; (iii) tendencia a dar dos frutos por nudo en aproximadamente el 20% de los nudos; (iv) tamaño y forma bastante uniformes; (v) intervalos cortos entre nudos, aprox. de 10 cm de largo; (vi), la producción de frutos comienza a partir de los primeros nudos y progresa a lo largo de la longitud de las ramas, de manera similar a las plantas no estériles; y (vii) la flor tiene pequeñas anteras sin polen.

Ejemplo 2: Genética del rasgo "sin semillas"

- 15 Para demostrar que el rasgo "sin semillas", descubierto en el tipo de pimiento "one-bite", es un rasgo independiente controlado por un determinante genético y, por lo tanto, que se puede transmitir genéticamente a muchos diferentes tipos de pimiento, se demuestra que el rasgo estará presente en la progenie de las poblaciones realizadas por el cruce de la planta sin semillas con otras plantas de tipo pimiento.

2.1 Historia del Cultivo: En primavera de 2007, la variedad SLP 255-1 se cruzó con 8 variedades de diferentes tipos; Blocky, Kapya y Conic. Los híbridos se cultivaron en otoño/invierno 2007-2008 y semillas F2 fueron recolectadas de 10 plantas F1.

	Nombre del Híbrido	Descripción	Nombre masculino	Nombre femenino
1	AR07-F1-56-b	Híbrido 255-1 x Kapya	NJ06-F3-385-4 (Kapya)	AR06-F3-255-1
2	ARO7-F1-87-B	Híbrido 255-1 x Kapya	NA06-F3-14-4 (Kapya)	AR06-F3-255-1
3	AR07-F1-166-b	Híbrido 255-1 x Conic	NJ06-F3-378-1 (conic)	AR06-F3-255-1
4	AR07-F1-171-x	Híbrido 255-1 x Blocky	AV05-F1-7158-TT (Blocky)	AR06-F3-255-1
5	AR07-F1-172-x	Híbrido 255-1 x Blocky	AV05-F1-7181-TT (Blocky)	AR06-F3-255-1

Ejemplo 3: Recuperación del rasgo "sin semillas" de los híbridos

3.1 *Diseño experimental*: Las 5 híbridos depositados se cultivaron a partir de muestras de la semilla depositada, 10 plantas individuales para cada uno (50 plantas en total). Semillas F2 de las plantas individuales se obtuvieron mediante auto-polinización. Las semillas F2 fueron recolectadas de las plantas y se mantuvieron separadas. Se sembraron 55 semillas F2 de cada planta F1 (2.750 semillas en total, 550 semillas por familia híbrida). El objetivo era conseguir 100-130 plantas F2 estériles de cada familia híbrida depositada (~25% de 550). El ensayo fue diseñado para que cada progenie F2 fuera trasplantada por separado. Además, como control, semillas F2 del híbrido original, donde el rasgo SLP fue descubierto en la progenie, también se sembraron 600 semillas de 3 plantas F1, 200 semillas de cada una. Las plantas F2 son entonces analizadas en cuanto a la expresión de un rasgo estéril masculino (MS) y el rasgo del pimiento sin semillas (SLP). Ambos rasgos se segregan por separado, sin embargo, el rasgo MS es necesario para tener al rasgo SLP fenotípicamente expresado. Mientras que en la línea femenina (línea SLP) el rasgo MS es homogéneo recesivo, en el híbrido F1 es heterogéneo (las líneas masculinas son todos fértiles masculinas homogéneas).

Como seguridad, semillas adicionales se sembraron una semana después. Este ciclo de siembra incluía las familias sembradas en el primer ciclo (en caso de que la germinación sea insuficiente) y familias F2 de otros híbridos para enriquecer la variación potencial.

Alrededor de 1 a 2 meses después, las plántulas se trasplantan a macetas y siguen creciendo en el vivero. El cribado y la selección de plantas estériles sin semillas se realizan por simple observación de las flores. Después de distinguir las plantas estériles, que se plantan en invernaderos (red blanca de malla 50 para evitar la polinización cruzada por parte de insectos) a una densidad de 2,500 plantas/1.000 m². El fenotipado partenocárpico se hace 2 semanas más tarde.

3.2 *Resultados*: El rasgo de esterilidad masculina (MS), que está comprendido en las semillas F2, se expresa con una tasa media de 27% (no lejos de la tasa teórica del 25% que se espera para un rasgo recesivo monogénico). El rasgo SLP solo se puede expresar fenotípicamente en un fondo MS. La tasa media de las plantas que expresan el rasgo SLP en una población de plantas MS es 23%, aunque el rasgo SLP no depende de las condiciones ambientales, el grado de expresión puede ser influenciado por el fondo genético de la línea masculina. Se extiende de 6% (híbrido original) hasta 36% en el híbrido AR07-F1-56-b hecho por el cruce de la planta SLP (AR06-F3-255-1) con la línea Kapya. En todos los ensayos basados en las líneas depositadas el rasgo SLP se pudo recuperar de forma coherente. Los datos indican que el rasgo SLP es un rasgo complejo con al menos 2 componentes genéticos primarios involucrados.

En todas las plantas de SLP, el 100% de los frutos eran sin semilla, y de todos estos frutos el 100% fueron sin semilla (no fueron fertilizados óvulos para convertirse en portadores de semillas). En el control fértil negativo solamente muy de vez en cuando se descubrió en algunos frutos individuales en una planta que eran sin semillas; sin embargo, esto es el resultado de efectos climáticos o la polinización irregular, pero no es un fenómeno genético.

Depósitos:

Las siguientes muestras de semillas de líneas de *Capsicum annuum* se depositaron ante NCIMB₁ Aberdeen AB21 9YA, Escocia, Reino Unido el 26 de mayo de 2008, bajo las disposiciones del Tratado de Budapest:

Designación de la línea de semillas de <i>Capsicum annuum</i>	Datos de depósito	Acceso N°
AR07-F1-56-b	26 de mayo de 2008	NCIMB 41558
AR07-F1-87-b	26 de mayo de 2008	NCIMB 41559
AR07-F1-166-b	26 de mayo de 2008	NCIMB 41560

AR07-F1-171-X	26 de mayo de 2008	NCIMB 41561
AR07-F1-172-X	26 de mayo de 2008	NCIMB41562

Lista de referencias

- Sjut V**, Bangerth F (1982) "Induced parthenocarp: a way of changing the levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.): 1. Extractable hormones." *Plant Growth Regul* 1: 243-251
- 5 **Kim IS**, Okubo H, Fujieda K. 1992. "Endogenous levels of IAA in relation to parthenocarp in cucumber (*Cucumis sativus* L.)." *Scientia Horticulturae* 52: 1-8.
- Beyer EM**, Quebedeaux B. 1974. "Parthenocarp in cucumber: mechanism of action of auxin transport inhibitors." *Journal of the American Society for Horticultural Science* 99: 385-390.
- Heuvelink** and Körner "Parthenocarpic Fruit Growth Reduces Yield Fluctuation and Blossom-end Rot in Sweet Pepper", *Annals of Botany*. 88(1):69-74, (2001)
- 10 **Rieger**, R. et al, A "Glossary of Genetics and Cytogenetics, Classical and Molecular Book Microbes Human", George Allen & Unwin Ltd.; Springer-Verlag, London; Berlin, Reino Unido; Alemania: 1968. 3ª ed. (rev.), 507 pp
- International Convention** for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV treaty), de 2 Dic. de 1961, Revisado en Ginebra el 10 Nov. de 1972, el 23 Oct. de 1978 y el 19 Mar. de 1991
- 15 **Poehlman** & Sleper (1995) "Breeding Field Crops", 4ª Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360-376,
- Daskaloff S**. 1972. Male sterile pepper (*C. annuum* L.) mutants and their utilization in heterosis breeding. *Eucarpia*, Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum. (Torino, Italia), pp. 205- 210.
- Peterson**, 1958 "Cytoplasmically inherited male-sterility in Capsicum." *Am. Nat.* 92:111-119.
- 20 **Michelmore, R. W.**, Para, I., y Kasser, R. V. (1991). "Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations." *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 9828-9832
- Mullis et al.**, "Specific enzymatic amplification of DNA in-vitro the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-274 (1986)
- 25 **Barany**, "Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase" *Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.)* 88:189 193 (1991)
- Landegren et al.**, "A ligase-mediated gene detection technique" *Science* 241:1077 1080 (1988)
- Nickerson et al.**, "Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay" *Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.)* 87:8923-8927 (1990)
- 30 **Wu et al.**, "The ligation amplification reaction (LAR) - amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation." *Genomics* 4:560-569 (1989)

Solicitud PCT WO 90/01069

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta de pimiento estéril masculina, que desarrolla frutos sin semillas de aspecto normal, en donde dichos frutos sin semillas se caracterizan por ser al menos 95% sin semillas, en donde el rasgo "sin semillas" es controlado por un determinante genético y es independiente del proceso de polinización y fecundación, es independiente de la aplicación de factores exógenos inductores de partenocarpia y/o del tratamiento con agentes inductores de partenocarpia administrados exógenamente, y es independiente de tratamiento exógeno con hormonas vegetales inductoras de partenocarpia, y en donde el rasgo "sin semillas" se puede obtener a partir de la planta de pimiento seleccionada del grupo de híbridos que consiste en *Capsicum annuum* AR07-F1-56-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-87-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-166-b; *Capsicum annuum* AR07-F1-171-X; y *Capsicum annuum* AR07-F1-172-X,
- 10 2. Una planta de pimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha planta es capaz de hacer fructificar frutos sin semillas en toda la planta.
- 15 3. Una planta de pimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la fructificación se inicia en los primeros nudos de una rama y progresa a lo largo de la longitud de la rama entera.
4. La planta de pimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que desarrolla frutos sin semillas que son comestibles y adecuados para ser utilizados como productos frescos, como productos cortados frescos, para el procesamiento o para la producción de alimento en conserva.
- 20 5. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha planta desarrolla pimiento seleccionados del grupo que consiste en un pimiento dulce incluyendo un pimiento de tipo dulce, un pimiento campana, un pimiento rectangular grande, un pimiento cónico, un pimiento largo cónico y un pimiento de tipo blocky.
6. La planta de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha planta es un híbrido.
- 25 7. Una planta de pimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho rasgo sin semillas se puede obtener a partir de dicha planta de pimiento híbrida cultivada a partir de dichas semillas depositadas, mediante un método que comprende las etapas de i) autofecundar dichas plantas híbridas cultivadas a partir de dichas semillas híbridas y ii) seleccionar una planta que desarrolla frutos de pimiento sin semilla, y iii) opcionalmente propagar después asexualmente dicha planta de pimiento sin semillas seleccionada.
8. Material vegetal que se puede obtener de una planta a partir de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 9. Partes de la planta de una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Fruto de una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Un fruto de acuerdo con la reivindicación 10 que es un fruto procesado.
12. Un método de producir frutos de pimiento sin semillas, como un producto alimenticio, que se caracteriza por
 - i) proporcionar una planta de pimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;
 - 35 ii) multiplicar/propagar dicha planta de pimiento;
 - iii) permitir que la planta desarrolle frutos de pimiento sin semillas; y
 - iv) recolectar dichos frutos de pimiento;

en el que la multiplicación/propagación de la etapa ii) se realiza mediante propagación vegetativa.

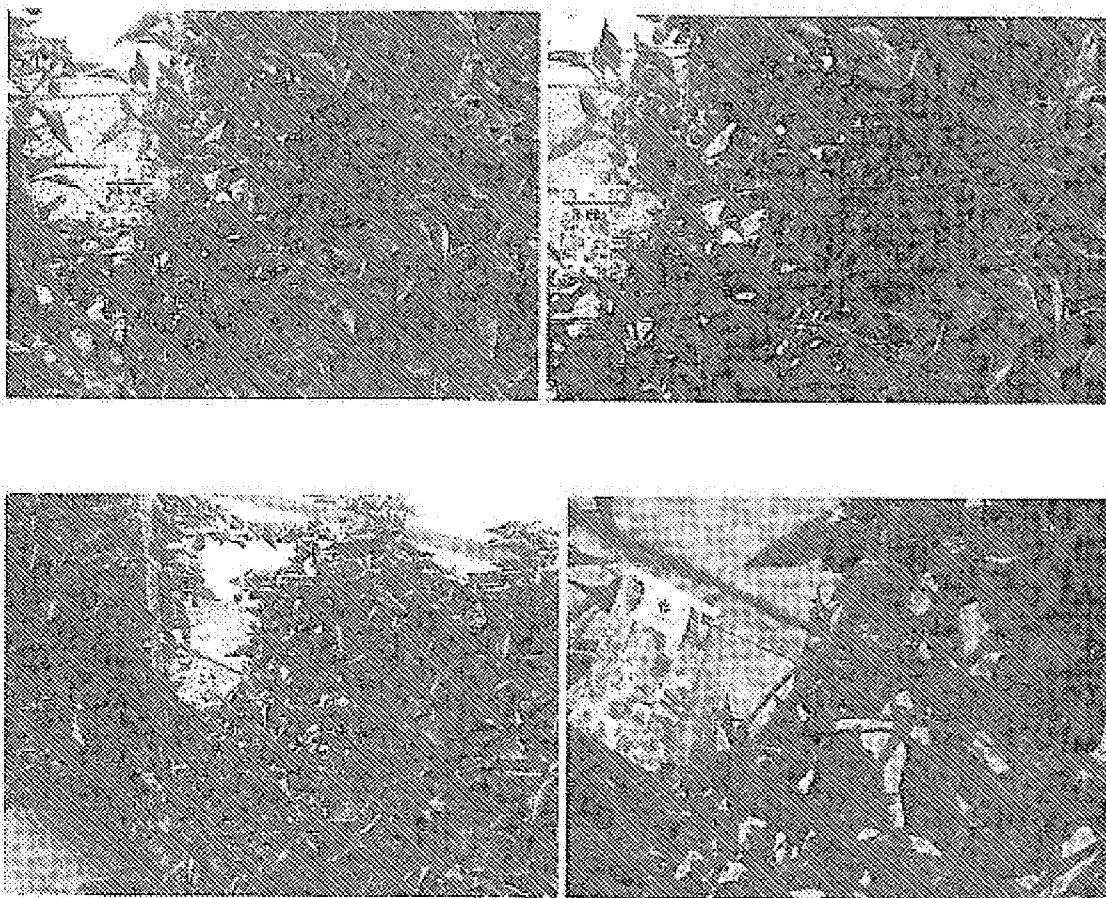


FIGURA 1

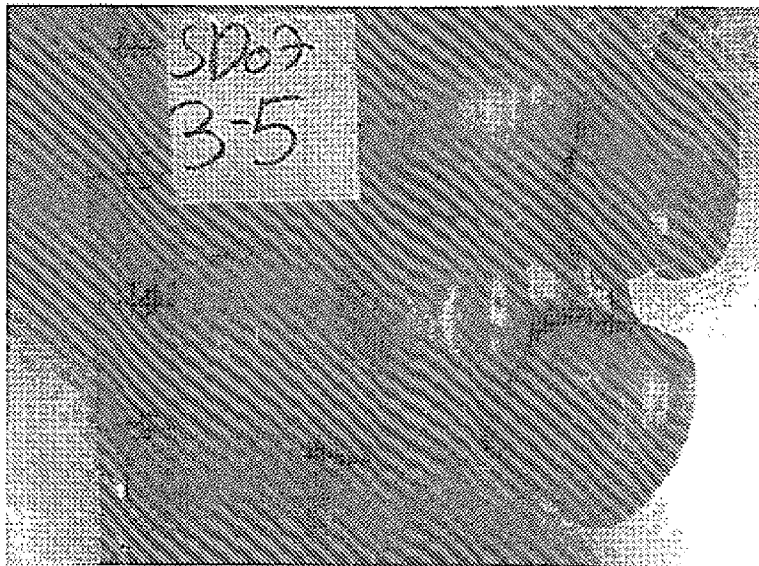


FIGURA 2



FIGURA 3