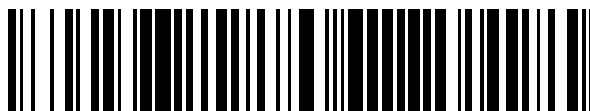


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 627**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/10 (2008.01)

A01H 5/02 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2007** **PCT/US2007/088902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2008** **WO08083198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2007** **E 07869951 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019** **EP 2102364**

54 Título: **Marcadores genéticos para resistencia a orobanca en girasol**

30 Prioridad:

28.12.2006 US 882279 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2019

73 Titular/es:

PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.
(100.0%)

7250 N.W. 62nd Avenue, P.O. Box 0552
Johnston, IA 50131-0552, US

72 Inventor/es:

EL SAYED, SADIK;
HOEFT, ERIC;
LI, ZENGLU y
TULSIERAM, LOMAS

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 711 627 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

Marcadores genéticos para resistencia a orobanca en girasol

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a métodos para usar marcadores genéticos moleculares para caracterizar el germoplasma de girasol para resistencia a *Orobanche cumana*.

10 Antecedentes

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.) se está cultivando como un cultivo de semillas oleaginosas cada vez más importante en muchas regiones del mundo templadas y semisecas.

15 El girasol cultivado es una fuente mundial importante de aceite vegetal. Los tipos de aceite de girasoles contienen 40 a 48 por ciento o más de aceite en la semilla. El aceite de girasol está valorado como un aceite comestible debido a su alto nivel de grasas insaturadas y su color claro. El aceite de girasol se utiliza para ensaladas, aceite de cocina o margarina. El contenido de proteínas de la harina de girasol preparada a partir de semillas después de la extracción de aceite es útil como alimento para el ganado. Las semillas de ambas variedades de aceite y de confitería del girasol
20 cultivado son útiles como alimento para aves.

La planta parásita orobanca (*Orobanche Spp.*) se ha vuelto un factor limitativo para los cultivos de girasol en los países infestados. La disminución en el rendimiento del cultivo puede alcanzar el 95 % en un campo afectado. Las especies de *Orobanche* particulares que afectan al girasol incluyen *Orobanche aegyptiaca* Pers., *O. ramosa* L., *O. minor* Sm.,
25 *O. cumana* Wallr. y *O. cernua* Loeffl.

Orobanche cumana Wallr. (también conocido como *O. cernua* Loeffl.) es una plaga severa en el girasol en Europa oriental y se ha extendido por el sur de Europa. En los últimos años, se ha observado el progreso de esta planta parásita, su introducción en nuevos países y el desarrollo de nuevas razas y más virulentas. *Orobanche* presenta un
30 riesgo mundial, y algunas especies tales como *O. minor* han aparecido como exóticas en los Estados Unidos.

A partir de 1996, se observó la aparición de tres nuevas razas de orobanca en campos en Turquía, España y Bulgaria. Para el año 2000, el número de campos afectados en estas áreas había aumentado bruscamente. Algunos productores dejaron de cultivar el girasol debido a la reducción significativa experimentada en la productividad del grano.
35

Estas malas hierbas son holoparásitos de raíz obligados. Las especies de *Orobanche* son muy difíciles de eliminar porque a excepción de sus partes de flor, viven en el suelo; sus semillas son diminutas y se producen prolíficamente, se dispersan fácilmente y son muy longevas. Por lo tanto, los herbicidas utilizados actualmente en el girasol proporcionan un control inadecuado.
40

Los medios de control de *Orobanche* incluyen agentes de control biológico, aislamiento de los genes responsables de la resistencia de *Orobanche* en el girasol, y el desarrollo de líneas de girasol resistentes.

Se ha informado que *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* puede ser un agente potencial para el control biológico de *Orobanche cumana* (Thomas-Heiko, et al., (Septiembre de 1998) Biological Control. 13(1):41-48). Sin embargo, aún no se han determinado los métodos de aplicación y las dosis uniformes en condiciones de campo.
45

El gen Or3 confiere resistencia al ataque de *Orobanche* pero se conoce por ser eficaz solo contra la raza C. Al menos se han informado seis variantes de razas de *Orobanche* (Perez-Vich, et al., (2004) Theor. Appl. Gen. 109:92-102; Antonova, T.S., et al., (1996) Weed Research 36(2):113-121).
50

La identificación y la utilización de fuentes adicionales de resistencia a *Orobanche* es beneficiosa en gestionar los cambios de razas y en minimizar la pérdida de producción.

55 Breve descripción de la invención

Esta invención se refiere a los métodos de uso de marcadores genéticos para la caracterización de germoplasma del girasol con respecto a la resistencia del Sistema 2 a *Orobanche cumana*. Las plantas y líneas identificadas que tienen rasgos de resistencia a *Orobanche* altamente hereditarios son útiles en el desarrollo de cultivares comerciales de
60 cultivos de girasol que tienen rasgos valiosos de calidad agronómica y/o de las semillas.

La invención proporciona un método para identificar una planta de girasol o germoplasma de girasol que tiene un fenotipo de resistencia del Sistema II a *Orobanche*, que comprende detectar en una planta de girasol o germoplasma de girasol al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) de un locus marcador que está asociado con dicho fenotipo, en donde el locus marcador está representado por la SEQ ID NO: 2 o presenta una frecuencia de recombinación inferior al 5 % con respecto al locus marcador de la SEQ ID NO: 2 y mapea para el grupo
65

de unión 4.

La invención proporciona además el uso de un marcador para generar marcadores adicionales para la resistencia a *Orobanche*; en donde dicho marcador es un marcador genético asociado con la resistencia del Sistema II a *Orobanche* y mapeo para el grupo de unión 4 de *Helianthus annuus*, comprendiendo dicho marcador la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o una variante que retiene al menos uno de los polimorfismos de la SEQ ID NO: 2 con respecto a la SEQ ID NO: 1.

La invención aún proporciona además un método para identificar genes o agrupaciones de genes en el genoma del girasol que dan lugar a la resistencia a *Orobanche*, comprendiendo amplificar una región cromosómica identificada por hibridación a un cebador seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 9, o 10, y comprendiendo además opcionalmente rondas sucesivas de cribado y aislamiento de clones para construir un cóntigo que comprende un marco de lectura abierto.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 proporciona un mapa de marcador parcial del grupo de unión 4 del girasol, incluyendo la posición de un supuesto gen de resistencia a orobanica del Sistema 2 (BRSII o BRII).

La figura 2 proporciona datos de mapeo adicionales con referencia al gen BRSII, incluyendo un marcador SNP para el rasgo de resistencia.

La figura 3 es un alineamiento de BestFit de alelos resistentes y susceptibles de los marcadores de BRSII (SEQ ID NOS: 2 y 1 respectivamente). Los polimorfismos están indicados por asteriscos.

La figura 4 es una tabla que proporciona datos de pedigrí y fenotípicos para la progenie de la población de mapeo.

Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID NO: 1 representa el alelo marcador para la susceptibilidad a *Orobanche* del Sistema 2.

La SEQ ID NO: 2 representa el alelo marcador para la resistencia a *Orobanche* del Sistema 2.

Las SEQ ID NO: 3 y 4 representan sondas utilizadas para identificar los alelos marcadores susceptibles a BRSII y resistentes a BRSII en las posiciones 105-106 de las SEQ ID NO: 1 y 2.

Las SEQ ID NO: 5 y 6 representan cebadores directos e inversos, respectivamente, para amplificar los alelos marcadores en las posiciones 105-106 de las SEQ ID NO: 1 y 2.

Las SEQ ID NO: 7 y 8 representan sondas utilizadas para identificar los alelos marcadores susceptibles a BRSII y resistentes a BRSII en la posición 142 de las SEQ ID NO: 1 y 2.

Las SEQ ID NO: 9 y 10 representan cebadores inversos y directos, respectivamente, para amplificar los alelos marcadores en la posición 142 de las SEQ ID NO: 1 y 2.

Descripción detallada de la invención

Aunque las secuencias específicas de ADN que codifican proteínas están generalmente bien conservadas dentro de una especie, las regiones no codificantes tienden a acumular polimorfismo, y por lo tanto pueden variar entre individuos de la misma especie. Dichas regiones proporcionan la base para numerosos marcadores genéticos moleculares. En general, cualquier polimorfismo de ácido nucleico heredado diferencialmente que se segrega de la progenie es un marcador molecular potencial. La variabilidad genómica de cualquier origen, incluyendo inserciones, deleciones, duplicaciones, elementos repetitivos, mutaciones puntuales, eventos de recombinación, y la presencia y la secuencia de elementos transponibles. También están bien establecidos los métodos para detectar marcadores moleculares.

Los marcadores que corresponden a polimorfismos genéticos entre los miembros de una población se pueden detectar mediante numerosos métodos, bien establecidos en la técnica, como los polimorfismos de longitud del fragmento de restricción, marcadores de isoenzimas, hibridación específica de alelos (ASH por sus siglas en inglés), secuencias variables amplificadas del genoma de la planta, replicación de la secuencia autosostenida, repetición de la secuencia simple (SSR por sus siglas en inglés), polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), o polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés). Los marcadores de la presente divulgación son SNP.

Los marcadores genéticos moleculares pueden facilitar el mapeo y la selección de rasgos agrícolamente importantes. Un marcador molecular que demuestra un desequilibrio de unión con un rasgo fenotípico deseado puede ser una herramienta útil para la selección asistida por marcador (MAS), que proporciona un medio para la identificación rápida de individuos o líneas deseables. La introgresión de genes preferidos en un cultivar también se facilita por MAS.

Los componentes de la implementación de MAS pueden incluir: (i) la creación de un mapa genético denso de marcadores moleculares, (ii) la detección de asociaciones estadísticas entre un marcador y la variabilidad fenotípica, (iii) la definición de un conjunto de alelos marcadores deseables, y (iv) la extrapolación de esta información al conjunto actual de germoplasma de fitomejoramiento para permitir que se tomen decisiones de selección basadas en marcadores.

En general, la identificación de marcadores para la aplicación de MAS implica el fenotipado del(los) rasgo(s) de interés

- y el genotipado de la población segregadora de progenies con marcadores polimórficos y el mapeo genético del rasgo deseado. Los detalles del mapeo se describen en otra parte en el presente documento. Los loci polimórficos en la vecindad del rasgo mapeado se eligen como marcadores potenciales (típicamente, un locus marcador más próximo al locus de interés es un marcador preferido). El análisis de unión se utiliza después para determinar qué secuencia
- 5 polimórfica del alelo marcador demuestra una posibilidad estadística de cosegregación con el fenotipo deseable (por lo tanto, un "alelo marcador"). Por lo tanto, es posible utilizar este marcador para el cribado rápido y preciso de las líneas de plantas para el alelo marcador sin la necesidad de cultivar las plantas a través de su ciclo de vida y esperar las evaluaciones fenotípicas. Asimismo, esto permite la selección genética del alelo particular incluso cuando se desconoce la identidad molecular de QTL (por sus siglas en inglés, locus de rasgos cuantitativos) de tolerancia real.
- 10 Se pueden tomar muestras de tejidos, por ejemplo, de la primera hoja de la planta y cribarse con el marcador molecular apropiado, y en unos días se determina cual progenie avanzará. El uso de marcadores unidos también elimina el impacto de los factores medioambientales que pueden influir en la expresión fenotípica, y, a diferencia de las evaluaciones de campo, el análisis de marcadores se puede realizar en cualquier momento del año.
- 15 Los fitomejoradores buscan combinaciones de loci con genes para el alto rendimiento y otros rasgos deseables para desarrollar variedades mejoradas. El cribado de grandes números de muestras mediante métodos no moleculares (por ejemplo, la evaluación de rasgos en plantas de girasol) puede ser costoso, lento y poco fiable. El uso de los marcadores polimórficos descritos en el presente documento proporciona un método eficaz para seleccionar variedades resistentes en programas de fitomejoramiento. Cuando una población está segregando múltiples loci que afectan a uno o múltiples
- 20 rasgos, por ejemplo, múltiples loci implicados en la tolerancia, o múltiples loci cada uno implicado en la tolerancia o resistencia a distintas enfermedades, la eficacia de MAS en comparación con el cribado fenotípico se vuelve incluso mayor, debido a que todos los loci pueden evaluarse en el laboratorio junto con una única muestra de ADN.
- Una aplicación específica de MAS en el cultivo de plantas es ayudar en la recuperación eficaz del genotipo progenitor
- 25 recurrente en el fitomejoramiento del retrocruzamiento. En el retrocruzamiento asistido por marcador de marcadores específicos (y QTL asociados) de una fuente donante, por ejemplo, para un contexto genético de élite, se selecciona entre la progenie de retrocruzamiento el rasgo del donante y después se utiliza el retrocruzamiento repetido para que la línea de élite reconstituya la mayor parte del genoma del contexto de élite como sea posible.
- 30 Por lo tanto, los marcadores y métodos divulgados en el presente documento pueden utilizarse para guiar la selección o el fitomejoramiento asistido por marcador de líneas de girasol con el complemento deseado de formas alélicas de segmentos de cromosomas asociados con un rendimiento agronómico superior. Ciertos aspectos de la divulgación abarcan los ácidos nucleicos que corresponden a los marcadores, que incluyen pero no se limitan a sondas, cebadores de amplificación, y productos de amplificación, todos los cuales son útiles en el genotipado de plantas, así como el
- 35 uso de dichos ácidos nucleicos para el paseo genómico para identificar secuencias adicionales o cóntigos adyacentes al(los) marcador(es) para la identificación de polimorfismo(s) de secuencia adicional(es) o alternativo(s) para el uso en la selección asistida por marcador. Más en general, estos marcadores son útiles en la saturación de un mapa genético de girasol.
- 40 La presente divulgación también se extiende a un método de fitomejoramiento de plantas parentales para formar plantas de girasol de la progenie y a estas plantas de la progenie, *per se*. Los métodos para cruzar y cultivar plantas de girasol están bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. La progenie resultante puede evaluarse para los alelos asociados con la resistencia y se puede seleccionar la progenie deseada. Dichas plantas o semillas de la progenie pueden venderse en el mercado para la producción del girasol, utilizadas para alimentos, procesadas para
- 45 obtener un constituyente deseado, o utilizadas adicionalmente en rondas posteriores de fitomejoramiento. Al menos una de las plantas parentales es una planta divulgada en el presente documento que comprende al menos una de las formas alélicas de los marcadores divulgados en el presente documento, de manera que la progenie es capaz de heredar el alelo.
- 50 La diversidad genética es importante para la ganancia genética a largo plazo en cualquier programa de fitomejoramiento. Con diversidad limitada, la ganancia genética se estabilizará eventualmente cuando todos los alelos favorables se hayan fijado dentro de la población de élite. Un objetivo es incorporar la diversidad en un grupo de élite sin perder la ganancia genética que ya se ha hecho y con la mínima inversión posible. MAS proporciona una indicación de qué regiones genómicas y qué alelos favorables de los ancestros originales se han seleccionado y conservado a
- 55 lo largo del tiempo, facilitando esfuerzos para incorporar una variación favorable de fuentes de germoplasma exóticas (progenitores que no están relacionados con el grupo de genes de élite) con la esperanza de encontrar alelos favorables que no existen actualmente en el grupo de genes de élite.
- Por ejemplo, los marcadores divulgados en el presente documento se pueden utilizar para MAS en cruces que implican
- 60 líneas de girasol de élite exóticas sometiendo a la progenie segregadora a MAS para mantener los alelos de principal productividad, junto con los alelos marcadores de resistencia en el presente documento.
- Además, la "clonación de genes posicionales" utiliza la proximidad de un marcador de tolerancia para definir físicamente un fragmento cromosómico aislado que contiene un QTL de tolerancia. El fragmento cromosómico aislado
- 65 puede producirse mediante dichos métodos bien conocidos como la digestión de ADN cromosómico con una o más enzimas de restricción, o mediante la amplificación de una región cromosómica en una reacción en cadena de la

polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) o cualquier reacción de amplificación alternativa adecuada. El fragmento digerido o amplificado está ligado típicamente en un vector adecuado para la replicación, y, por ejemplo, la expresión, del fragmento insertado. Los marcadores que son adyacentes a un marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) asociado con un rasgo fenotípico pueden hibridarse con un clon de ADN (por ejemplo, un clon de una biblioteca de ADN genómico), identificando así un clon en el que se localiza un ORF (o un fragmento de un ORF). Si el marcador está más distante, un fragmento que contiene el marco de lectura abierto se identifica por rondas sucesivas de cribado y aislamiento de clones que juntos comprenden una secuencia contigua de ADN, un proceso denominado "paseo cromosómico", que da como resultado un "cóntigo" o "mapa de cóntigos". Los protocolos suficientes para guiar a un experto en el aislamiento de clones asociados con marcadores unidos se encuentran en, por ejemplo, Berger, Sambrook y Ausubel, *infra*.

Ciertos mapas de unión del genoma del girasol están disponibles; véase, por ejemplo, Tang, et al., "PCR-multiplexes for a genome-wide framework of simple sequence repeat marker loci in cultivated sunflower," (2003) Theor. Appl. Genet. 107:6-19; Yu, et al., "Towards a Saturated Molecular Genetic Linkage Map for Cultivated Sunflower," (2003) Crop Science 43:367-387; Lai, et al., "Identification and Mapping of SNPs from ESTs in Sunflower," (2005) Theor. Appl. Genet. 111:1532-1544; Kusterer, et al., "Molecular Mapping of the Fertility Restoration Locus Rf1 in Sunflower and Development of Diagnostic Markers for the Restorer Gene," (2005) Euphytica 143:35-42; Perez-Vich, et al., "Molecular Mapping of Nuclear Male Sterility Genes in Sunflower," (2005) Crop Sci. 45:1851-1857; y Chen, et al., "Molecular Mapping of a Nuclear Male-Sterility Gene in Sunflower using TRAP and SSR Markers," (2006) Theor. Appl. Gen. 113(1): 122-127. Un marcador puede estar enlazado a uno o más loci de interés, por ejemplo, un único gen, un locus de rasgos cuantitativos (QTL), u otro marcador.

La mayoría de marcadores genéticos se basan en una o más propiedades de ácidos nucleicos para su detección. Por ejemplo, algunas técnicas para detectar marcadores genéticos utilizan la hibridación de una sonda de ácidos nucleicos a ácidos nucleicos que corresponden al marcador genético. Los formatos de hibridación incluyen, pero no se limitan a, fase en solución, fase sólida, fase mixta o ensayos de hibridación *in situ*. Los marcadores de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) se detectan mediante hibridación de una sonda con ADN genómico digerido con enzimas de restricción. La sonda es típicamente un subfragmento (o un oligonucleótido sintético que corresponde a un subfragmento) del ácido nucleico que se debe detectar. La enzima de restricción se selecciona para proporcionar fragmentos de restricción de al menos dos longitudes alternativas (o polimórficas) en varios individuos, y variarán a menudo de una línea a otra. Determinar qué enzima(s) de restricción produce(n) los fragmentos informativos para cada combinación de individuos es un procedimiento simple, bien conocido en la técnica. Después de la separación por longitud en una matriz apropiada (por ejemplo, agarosa) y la transferencia a una membrana (por ejemplo, nitrocelulosa, nailon), la sonda marcada se hibrida en condiciones que dan como resultado la unión en equilibrio de la sonda a la diana, seguido de la eliminación de la sonda de exceso por lavado.

Las sondas de ácidos nucleicos para los loci marcadores se pueden clonar y/o sintetizar. Las etiquetas detectables adecuadas para el uso con sondas de ácidos nucleicos incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, radioisotópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las etiquetas útiles incluyen biotina para la coloración con conjugado de estreptavidina etiquetado, perlas magnéticas, colorantes fluorescentes, radiomarcadores, enzimas y etiquetas colorimétricas. Otras etiquetas incluyen ligandos que se unen a anticuerpos etiquetados con fluoróforos, agentes quimioluminiscentes y enzimas. Los marcadores de etiquetado se consiguen fácilmente como por ejemplo con el uso de cebadores de PCR etiquetados para los loci marcadores.

La sonda hibridada se detecta después, más típicamente por autorradiografía u otra técnica de detección similar (por ejemplo, fluorografía o contador de centelleo líquido). Ejemplos de protocolos de hibridación específicos están ampliamente disponibles en la técnica, véase, por ejemplo, Berger y Kimmel (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology vol.152, Academic Press, Inc., San Diego ("Berger"); Sambrook, et al., (2001) Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 3ª ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor ("Sambrook"); y Ausubel, et al., (eds) (complementado hasta 2001) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. ("Ausubel").

"Secuencias variables amplificadas" se refiere a secuencias amplificadas del genoma de la planta que presentan alta variabilidad de restos de ácidos nucleicos entre miembros de la misma especie. Todos los organismos tienen secuencias genómicas variables y cada organismo (con la excepción de un clon) tiene un conjunto diferente de secuencias variables. Una vez identificada, la presencia de la secuencia variable específica puede utilizarse para predecir rasgos fenotípicos. Preferentemente, el ADN de la planta sirve como molde para la amplificación con cebadores que flanquean una secuencia variable de ADN. La secuencia variable se amplifica y después se secuencía.

Las técnicas de amplificación *In vitro* se conocen bien en la técnica. Ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a las personas expertas a través de dichos métodos *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación de Q β -replicasa y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), se encuentran en Berger, Sambrook y Ausubel (todossupra) así como Mullis, et al., (1987) Patente de EE.UU. n° 4.683.202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis, et al., eds.) Academic Press Inc., San Diego Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (1 de octubre de 1990)

C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3:81-94; Kwoh, et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173; Guatelli, et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874; Lomell, et al., (1989) J. Clin. Chem 35:1826; Landegren, et al., (1988) Science 241:1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291-294; Wu y Wallace, (1989) Gene 4:560; Barringer, et al., (1990) Gene 89:117; y Sooknanan y Malek (1995) Biotechnology 13:563-564. Los métodos mejorados para clonar ácidos nucleicos amplificados *in vitro* se describen en Wallace, et al., en la patente de EE.UU. n.º 5.426.039. Los métodos mejorados para amplificar ácidos nucleicos grandes por PCR se resumen en Cheng, et al., (1994) Nature 369:684, y las referencias en el mismo, en donde se generan los amplicones de PCR de hasta 40 kb. Un experto apreciará que esencialmente cualquier ARN puede convertirse en un ADN bicatenario adecuado para la digestión de restricción, la expansión por PCR y la secuenciación utilizando transcriptasa inversa y una polimerasa. Véase, Ausubel, Sambrook y Berger, *todos supra*.

Los oligonucleótidos para el uso como cebadores, por ejemplo, en reacciones de amplificación y para el uso como sondas de secuencias de ácidos nucleicos, típicamente se sintetizan químicamente de acuerdo con el método de triéster fosforamídita de fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers (1981) Tetrahedron Lett. 22:1859, o simplemente se puede pedir comercialmente.

Como alternativa, la replicación de la secuencia autosostenida se puede utilizar para identificar marcadores genéticos. La replicación de la secuencia autosostenida se refiere a un método de amplificación de ácidos nucleicos que utiliza secuencias de ácidos nucleicos objetivo que se replican exponencialmente *in vitro* bajo condiciones sustancialmente isotérmicas utilizando tres actividades enzimáticas implicadas en la replicación retroviral: (1) transcriptasa inversa, (2) Rnasa H, y (3) una ARN polimerasa dependiente de ADN (Guatelli, et al., (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:1874). Al imitar la estrategia retroviral de la replicación del ARN mediante los intermedios de ADNc, esta reacción acumula copias de ADNc y de ARN del objetivo original.

Mapa de loci marcadores

Se han desarrollado múltiples paradigmas experimentales para identificar y analizar marcadores moleculares. En general, estos paradigmas implican el cruzamiento de uno o más pares parentales, que pueden ser, por ejemplo, un único par derivado de dos cepas consanguíneas, o múltiples progenitores relacionados o sin relacionar de distintas cepas o líneas consanguíneas, que presentan diferentes características con respecto al rasgo fenotípico de interés. Los progenitores y una población de la progenie son genotipados para loci marcadores y se evalúan fenotípicamente para el rasgo de interés. En el contexto de la presente invención, las plantas parentales y de la progenie son genotipados para el marcador BRSII u homólogos, o marcadores alternativos unidos al marcador BRSII, y se evalúan para la resistencia a *Orobanche*. Los marcadores asociados con la resistencia se identifican basándose en correlaciones estadísticas significativas entre el(los) genotipo(s) marcador(es) y los fenotipos de las plantas de la progenie evaluada. Numerosos métodos para determinar si los marcadores están unidos genéticamente a un gen asociado con la resistencia a *Orobanche* son conocidos por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, mapeo de intervalos (Lander y Botstein (1989) Genetics 121:185), mapeo de regresión (Haley y Knott (1992) Heredity 69:315) y mapeo MQM (Jansen (1994) Genetics 138:871). Véase también, las patentes de EE. UU. 6.399.855 y 6.368.806.

Dos tipos de marcadores que se usan a menudo en los protocolos de selección asistida por marcador son los marcadores de repeticiones de secuencias simples (SSR por sus siglas en inglés, también conocidos como microsatélite) y los marcadores de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés). El término SSR se refiere generalmente a un tipo de heterogeneidad molecular que da como resultado una variabilidad de longitud, y más típicamente es un segmento corto (hasta varios cientos de pares de bases) de ADN que consiste en múltiples repeticiones en tándem de una secuencia de dos o tres pares de bases. Estas secuencias repetidas dan como resultado regiones de ADN altamente polimórficas de longitud variable debido a una fidelidad de replicación escasa, por ejemplo, provocada por el deslizamiento de la polimerasa. Los SSR parecen estar dispersados aleatoriamente a través del genoma y están flanqueados generalmente por regiones conservadas. Las repeticiones de dinucleótidos se encuentran en plantas superiores (Condit y Hubbell (1991) Genome 34:66).

La variabilidad genómica de SSR es hereditaria, multialélica, codominante y detectable de manera reproducible, haciendo que los SSR sean adecuados para el uso como marcadores genéticos moleculares. La proliferación de técnicas de detección basadas en amplificación cada vez más sofisticadas (por ejemplo, PCR) proporciona una variedad de métodos sensibles para la detección de heterogeneidad de secuencias de nucleótidos. Los cebadores (u otros tipos de sondas) están diseñados para hibridarse con regiones conservadas que flanquean el dominio de SSR, dando como resultado la amplificación de la región variable de SSR. Los diversos amplicones generados a partir de una región de SSR tienen tamaños característicos y reproducibles. Los amplicones de SSR de distintos tamaños observados a partir de dos cromosomas homólogos en un individuo, o de diferentes individuos en la población de plantas, se denominan generalmente "alelos marcadores". Mientras que existan dos alelos SSR que produzcan productos de PCR con al menos dos tamaños diferentes, el SSR puede emplearse como un marcador. Los marcadores SSR se pueden desarrollar a partir de ADN genómico o EST (etiquetas de secuencias expresadas).

Los marcadores que se basan en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son también bien conocidos en la técnica. Un SNP se produce cuando se altera un solo nucleótido (A, T, C o G) en la secuencia genómica o cuando ocurre una inserción/delección. El SNP puede o no dar como resultado un cambio funcional del gen. Se han desarrollado varias

- técnicas para la detección de SNP, que incluyen el método de hibridación específica del alelo (ASH; véase, por ejemplo, Coryell, et al., (1999) "Allele specific hybridization markers for soybean," *Theor. Appl. Genet.* 98:690-696). Los expertos en la materia conocen perfeccionamientos del análisis de SNP y adaptaciones para el uso en sistemas de alto rendimiento; véase, por ejemplo, Shirasawa, et al., (2006) *Theor. Appl. Genet.* 113(1): 147-155; Giancola, et al., (2006) *Theor. Appl. Genet.* 112(6):1115-1124. Un marcador SSR puede servir como una primera etapa en el desarrollo de un marcador SNP; véase, Brooks, et al., (2006) *Crop Sci.* 46(4):1467-1470. Los marcadores SSR y SNP se pueden utilizar en combinación; véase, Gilson, et al., (2006) *Transgenic Res.* 15(6):785-786. Se ha informado sobre el análisis de SNP de secuencias promotoras (Schwarz, et al., (2003) *J. Agr. Food Chem.* 51(15):4263-4267).
- También se utilizan ampliamente tipos adicionales de marcadores moleculares, incluyendo el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP por sus siglas en inglés), polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP por sus siglas en inglés), ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD por sus siglas en inglés) y marcadores de isoenzimas. Los expertos en la materia conocen un amplio intervalo de protocolos para detectar esta variabilidad, y estos protocolos son frecuentemente específicos para el tipo de polimorfismo para cuya detección están diseñados, incluyendo, por ejemplo, amplificación por PCR, polimorfismos de conformación monocatenaria (SSCP por sus siglas en inglés) y replicación de la secuencia autosostenida (3SR; véase, Chan y Fox (1999) "NASBA and other transcription-based amplification methods for research and diagnostic microbiology," *Reviews in Medical Microbiology* 10:185-196).
- Independientemente de su naturaleza molecular, por ejemplo, si un marcador es un SSR, SNP, RFLP, u otro tipo, los marcadores son típicamente específicos de la cepa; es decir, un marcador particular se define con respecto a las líneas parentales de interés. Para cada locus marcador, se identifican alelos de resistencia y de susceptibilidad para cada par de líneas parentales. Siguiendo la correlación de alelos específicos con resistencia o susceptibilidad en las líneas parentales, el marcador se puede utilizar para identificar la progenie con genotipos que corresponden al fenotipo deseado.
- La vinculación de un marcador molecular a un locus de interés se mide como una frecuencia de recombinación, que establece la distancia (en centiMorgans, cM) entre los puntos de referencia en el mapa genético. La distancia física entre loci se mide en pares de bases, por ejemplo, el número de kilopares de bases (kb) o megapares de bases (Mbp) con los que dos loci se separan uno del otro en un cromosoma. En general, cuanto más cerca estén los dos loci (por ejemplo, un marcador SNP y un QTL) en el mapa genético, más cerca estarán uno del otro en el mapa físico. Mientras que la distancia genética relativa es generalmente proporcional a la distancia entre los loci, la correlación imprecisa entre cM y la distancia física puede resultar de la variación en las frecuencias de recombinación para diferentes regiones cromosómicas. Algunas regiones cromosómicas son "puntos calientes" de recombinación, mientras que otras regiones no muestran ninguna recombinación o demuestran solo eventos raros de recombinación. En general, cuanto más cerca está un marcador del locus de interés, ya sea medido en términos de recombinación o de distancia física, mejor sirve para señalar el rasgo seleccionable deseado.
- El objetivo del fitomejorador es enriquecer la población vegetal para individuos con los rasgos deseados, lo que en última instancia conduce a una productividad agrícola mejorada. Se sabe que los loci cromosómicos específicos (o intervalos) que se pueden mapear en el genoma de un organismo pueden correlacionarse con fenotipos cuantitativos particulares. Dichos loci se denominan loci de rasgos cuantitativos o QTL. El fitomejorador puede utilizar ventajosamente marcadores moleculares para identificar los individuos deseados identificando los alelos marcadores que muestran una probabilidad estadísticamente significativa de cosegregación con un fenotipo deseado, manifestado como desequilibrio de unión. Al identificar un marcador molecular o agrupación de marcadores moleculares que se cosegrega con un rasgo cuantitativo, el fitomejorador está identificando por lo tanto un QTL. Se han desarrollado múltiples paradigmas para identificar y analizar marcadores QTL (véase, por ejemplo, Jansen (1996) *Trends Plant Sci* 1:89). La mayoría de los informes publicados sobre el mapeo de QTL se han basado en el uso del cruce biparental (Lynch y Walsh (1997) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*, Sinauer Associates, Sunderland). Al identificar y seleccionar un alelo marcador (o alelos deseados de marcadores múltiples) que se asocia con el fenotipo deseado, el fitomejorador es capaz de seleccionar rápidamente el fenotipo deseado. Este proceso se denomina selección asistida por marcador o MAS. Cuando más marcadores moleculares se colocan en el mapa genético, más potencialmente útil se vuelve este mapa para realizar la MAS.
- Numerosos métodos estadísticos para determinar si los marcadores están unidos genéticamente a un locus de interés son conocidos por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, modelos lineales estándar, como ANOVA o mapeo de regresión (Haley y Knott (1992) *Heredity* 69:315), los métodos de máxima probabilidad tales como algoritmos de expectativa-maximización, (por ejemplo, Lander y Botstein (1989) "Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps," *Genetics* 121:185-199; Jansen (1992) "A general mixture model for mapping quantitative trait loci by using molecular markers," (1993) *Theor. Appl. Genet.*, 85:252-260; Jansen (1994) "Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm," *Biometrics* 49:227-231; Jansen (1994) "Mapping of quantitative trait loci by using genetic markers: an overview of biometrical models," En J.W. van Ooijen and J. Jansen (eds.), *Biometrics in Plant breeding: applications of molecular markers*, pág. 116-124, CPRO-DLO Netherlands; Jansen (1996) "A general Monte Carlo method for mapping multiple quantitative trait loci," *Genetics* 142:305-311; y Jansen y Stam (1994) "High Resolution of quantitative trait into multiple loci via interval mapping," *Genetics* 136:1447-1455). Los métodos estadísticos ejemplares incluyen análisis de marcadores de un solo punto, mapeo por intervalos (Lander y Botstein (1989) *Genetics* 121:185), mapeo por intervalos compuestos, análisis de

regresión penalizado, análisis complejo de pedigrí, análisis MCMC, análisis MQM (Jansen (1994) Genetics 138:871), análisis HAPLO-IM+, análisis HAPLO-MQM, análisis HAPLO-MQM+, MCMC bayesiano, regresión contraída, análisis de identidad por descendencia y regresión de Haseman-Elston, cualquiera de ellos es adecuado en el contexto de la presente invención. Los detalles adicionales con respecto a los métodos estadísticos alternativos aplicables a poblaciones de fitomejoramiento complejo que se pueden utilizar para identificar y localizar QTL se describen en: la patente de EE. UU. número 6.399.855 de Beavis, et al., "QTL Mapping in Plant Breeding Populations" y el documento WO2001/049104 de Jansen, et al., "MQM Mapping Using Haplotyped Putative QTL-Alleles: A Simple Approach for Mapping QTLs in Plant Breeding Populations". Estos enfoques son computacionalmente intensivos y se realizan normalmente con la asistencia de un sistema informático y software especializado. Los paquetes estadísticos apropiados están disponibles de una variedad de fuentes públicas y comerciales, y se conocen por los expertos en la materia.

Existe una necesidad en la técnica de un germoplasma de girasol mejorado que sea resistente a *Orobanche cumana*. Existe una necesidad en la técnica de la identificación de marcadores moleculares que se unen a loci de resistencia a *Orobanche cumana* para facilitar la MAS. Dichos marcadores se pueden utilizar para seleccionar plantas individuales y poblaciones vegetales que muestran alelos marcadores favorables que se pueden emplear después para seleccionar el fenotipo resistente. Como alternativa, los marcadores se pueden utilizar para contraseleccionar plantas o poblaciones vegetales que son susceptibles a *Orobanche cumana*. La presente divulgación proporciona composiciones y métodos que satisfacen estas necesidades y proporcionan otras ventajas.

Se proporcionan métodos para identificar plantas o germoplasma de girasol que presentan resistencia, resistencia mejorada o susceptibilidad a *Orobanche cumana*. Se divulgan también métodos para producir plantas o germoplasma de girasol que son resistentes o tienen resistencia mejorada a *Orobanche cumana*, por ejemplo, en los que se crean plantas resistentes a través de la introgresión de alelos marcadores de resistencia deseados (por ejemplo, selección asistida por marcadores) y/o por métodos de producción transgénicos. Las plantas o germoplasma producidos por los métodos divulgados en el presente documento son también un aspecto de la divulgación. Los sistemas para identificar plantas y germoplasma que se predice que tienen resistencia, resistencia mejorada o susceptibilidad a *Orobanche cumana* son también una característica de la divulgación, al igual que los kits que facilitan los métodos divulgados en el presente documento.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona métodos para identificar una primera planta de girasol que tiene resistencia, resistencia mejorada o susceptibilidad a *Orobanche cumana*. En los métodos, al menos un alelo de un locus marcador que está asociado con la resistencia, resistencia mejorada, o fenotipo de susceptibilidad se detecta en la primera planta de girasol. El locus marcador puede ser BRSII.

Por lo general, el locus estrechamente unido presenta una frecuencia de recombinación genética de menos de aproximadamente 10 % con referencia al locus marcador. En realizaciones deseables, el locus unido presenta una frecuencia de recombinación genética del 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,75 %, 0,5 % o 0,25 %, o menos.

De forma deseable, se identifican las plantas que tienen al menos un alelo favorable que se correlaciona positivamente con la resistencia o la resistencia mejorada. Opcionalmente, dos, tres o más alelo(s) favorable(s) se identifican en, o se introgresan en, la planta. Se puede utilizar cualquier técnica adecuada para evaluar la resistencia o la susceptibilidad de una planta de girasol a *Orobanche cumana*. Por ejemplo, la resistencia se puede puntuar en una ubicación de campo conocida por albergar semillas de *Orobanche*, o el nivel de resistencia se puede puntuar utilizando condiciones de invernadero o vivero controladas. Los métodos de cribado se describen en detalle en el documento WO 2003/073837.

Cualquiera de una variedad de métodos moleculares puede utilizarse para detectar un alelo marcador. Por ejemplo, se puede detectar una forma alélica de una repetición de la secuencia simple polimórfica (SSR) mediante una tecnología basada en amplificación tal como la PCR. Como alternativa, se puede detectar un alelo marcador de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) por una etapa de amplificación seguida por un ensayo de hibridación específica de alelo (ASH). En estos y otros métodos de detección basados en amplificación, el locus marcador o una parte del mismo se amplifica (por ejemplo, mediante PCR, LCR o transcripción utilizando un ácido nucleico aislado de una planta de interés como un molde) y se detecta el amplicón marcador resultante.

En un ejemplo, un cebador de amplificación o un par de cebadores de amplificación (por ejemplo, un par de cebadores proporcionado como las SEQ ID NOS: 5 y 6) se mezcla con el ácido nucleico genómico aislado de la primera planta de girasol, en donde el cebador o el par de cebadores es complementario o parcialmente complementario de al menos una parte del locus marcador, y es capaz de iniciar la polimerización del ADN mediante una ADN polimerasa utilizando el ácido nucleico genómico del girasol como molde. El cebador o par de cebadores (por ejemplo, un par de cebadores que amplifica el locus marcador BRSII) se extiende en una reacción de polimerización de ADN que tiene una ADN polimerasa y un ácido nucleico genómico molde para generar al menos un amplicón. En cualquier caso, los datos que representan el(los) alelo(s) detectado(s) se pueden transmitir (por ejemplo, electrónicamente o por infrarrojos, por transmisión inalámbrica u óptica) a un ordenador o medio legible por ordenador para su análisis o almacenamiento.

Se apreciará que la capacidad para identificar un locus marcador favorable que se correlaciona con la resistencia a *Orobanche* proporciona un método para seleccionar plantas con un rasgo de resistencia favorable. Es decir, cualquier

planta que se identifica por comprender un locus marcador deseado puede seleccionarse, mientras que las plantas que carecen de este locus, o que tienen un locus que está correlacionado negativamente con la resistencia, pueden seleccionarse en contra.

- 5 Por lo tanto, en un método, posterior a la identificación de un locus marcador favorable, los métodos incluyen seleccionar la primera planta de girasol, o seleccionar la progenie de la primera planta. Asimismo, la planta de girasol seleccionada puede cruzarse con una segunda planta de girasol (por ejemplo, un girasol de élite o exótico, dependiendo de las características que se desean en la progenie). De forma similar, si un alelo está correlacionado con la resistencia a *Orobanche*, un método puede comprender introgresar el alelo en una segunda planta de girasol.
- 10 De forma deseable, la segunda planta de girasol presenta menos resistencia a *Orobanche* que la primera planta de girasol, mientras que la planta de girasol introgresada presenta una tolerancia aumentada a *Orobanche* en comparación con la segunda planta. En algunos aspectos, una planta de girasol de élite se utiliza como la segunda planta para la introgresión. Una planta o germoplasma de girasol introgresados producidos por cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento también es una característica de la presente divulgación.

- 15 Los enfoques transgénicos también pueden utilizarse para producir plantas o germoplasma de girasol resistentes a *Orobanche*. Por ejemplo, los métodos para producir una planta de girasol que tiene resistencia mejorada a *Orobanche* pueden incluir introducir un ácido nucleico exógeno en una planta de girasol objetivo, en donde el ácido nucleico exógeno está derivado de una secuencia de nucleótidos genómica que está estrechamente unida a un locus marcador favorable asociado con la resistencia mejorada a *Orobanche*. El locus marcador puede ser BRSII y/o un locus genético unido al mismo.
- 20

- Cualquiera de una variedad de métodos puede utilizarse para proporcionar el ácido nucleico exógeno. En un método, la secuencia de nucleótidos se aísla por clonación posicional y se identifica por la unión al alelo favorable. La composición precisa del ácido nucleico exógeno puede variar; en un aspecto, el ácido nucleico exógeno corresponde a un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un polipéptido que, cuando se expresa en una planta de girasol, da como resultado una planta de girasol que tiene resistencia mejorada a *Orobanche*.
- 25

- Los sistemas para identificar una planta de girasol que se predice que tienen resistencia, resistencia mejorada, o susceptibilidad a *Orobanche* son también una característica de la divulgación. Por lo general, el sistema puede incluir (a) un conjunto de sondas o cebadores marcadores configurados para detectar al menos un alelo favorable de un locus marcador asociado con resistencia a *Orobanche*, en donde el locus marcador puede ser BRSII o un locus genético unido al mismo; (b) un detector que está configurado para detectar una o más salidas de señal del conjunto de sondas o cebadores marcadores, o un amplicón del mismo, identificando de este modo la presencia o ausencia del alelo; y (c) instrucciones del sistema que correlacionan la presencia o ausencia del alelo favorable con la resistencia o susceptibilidad predicha. En algunos aspectos, el conjunto de sondas o cebadores marcadores comprende secuencias de nucleótidos proporcionadas en las SEQ ID NOS: 3-6.
- 30
- 35

- La configuración precisa del detector dependerá del tipo de etiqueta utilizada para detectar el alelo marcador. Los aspectos típicos incluyen detectores de luz y detectores de radioactividad. La detección de una emisión de luz (o emisiones de luz múltiples) u otra etiqueta de sonda es indicativa de la presencia o ausencia de un alelo marcador. De forma similar, la forma precisa de las instrucciones puede variar dependiendo de los componentes del sistema, por ejemplo, pueden estar presentes como un software de sistema en una o más unidades integradas del sistema o pueden estar presentes en uno o más ordenadores o medios legibles por ordenador acoplados de manera operativa al detector. En un aspecto típico, las instrucciones del sistema incluyen al menos una tabla de consulta que incluye una correlación entre la presencia o ausencia del alelo favorable y la resistencia predicha o la resistencia mejorada.
- 40
- 45

- El sistema puede estar compuesto de elementos separados o puede estar integrado en una sola unidad para la detección conveniente de alelos marcadores y para realizar correlaciones de marcador-rasgo. El sistema también puede incluir una muestra tal como ADN genómico, ADN genómico amplificado, ADNc, ADNc amplificado, ARN o ARN amplificado de girasol o de un tejido vegetal de girasol seleccionado.
- 50

- Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona con una habilidad habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención. A menos que se mencione de otro modo, las técnicas empleadas o contempladas en el presente documento son metodologías estándar bien conocidas por una persona experta en la materia.
- 55

- En el ámbito de la presente divulgación, se usará un número de términos. Para proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, incluido el alcance que se le dará a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.
- 60

- "Alelo" se refiere a una o más secuencias de nucleótidos que pueden ocurrir en un locus cromosómico específico. Un individuo diploide heterocigoto tiene dos formas diferentes de una secuencia, o alelo, en los loci correspondientes del par de cromosomas. Un individuo diploide homocigoto tiene dos copias del mismo alelo en los loci correspondientes de los cromosomas homólogos.
- 65

Un "alelo favorable" puede ser el alelo en un locus particular que confiere, o contribuye a, un fenotipo agronómicamente deseable. En otras circunstancias, un "alelo favorable" puede ser uno que permita la identificación de plantas con rasgos agronómicos negativos, tal como susceptibilidad a enfermedades.

- 5 Un alelo se correlaciona "positivamente" con un rasgo cuando la presencia del alelo es un indicador de que el rasgo deseado o forma de rasgo ocurrirá en una planta que comprende ese alelo. Un alelo se correlaciona "negativamente" con un rasgo cuando la presencia del alelo es un indicador de que un rasgo deseado o forma de rasgo no ocurrirá en una planta que comprende el alelo.

- 10 "Frecuencia alélica" se refiere a la frecuencia a la que un alelo está presente en un locus dentro de un individuo, dentro de una línea o dentro de una población de líneas. Por ejemplo, para un alelo "A", los individuos diploides de genotipo "AA," "Aa," o "aa" tienen frecuencias alélicas de 1,0, 0,5, o 0,0, respectivamente.

- 15 El término "asociado con" o "asociado" en el contexto de esta invención se refiere a, por ejemplo, un ácido nucleico y un rasgo fenotípico que están en desequilibrio de unión, es decir, el ácido nucleico y el rasgo se encuentran juntos en plantas de la progenie más a menudo que si el ácido nucleico y el fenotipo se segregaran por separado.

- 20 "Orobanca", "*Orobanche cumana*" "*Orobanche cumana* Wallr.", "*O. cernua* Loeffl", "*Orobanche*". y "*O. cumana*" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a la maleza parasitaria descrita y sus razas.

- El término "centiMorgan" significa una unidad de medida de la frecuencia de recombinación. Un centiMorgan representa un 1 % de posibilidad de que un marcador en un primer locus genético, en una sola generación, se separe del marcador en un segundo locus debido al cruzamiento.

- 25 "Estéril masculino citoplasmático" o "CMS": Una línea de girasol que no produce polen viable se denomina estéril masculino. La esterilidad masculina citoplásmica se hereda por vía materna, es decir, la planta estéril masculina se utiliza como línea parental femenina en un cruce con polen de otro girasol. Las líneas de CMS se producen cruzando una línea de mantenimiento con una planta de girasol con el rasgo de esterilidad masculina citoplásmica y después retrocruzando con la línea de mantenimiento hasta que se desarrolle una línea estéril masculina que es homóloga a la línea de mantenimiento en todos los otros aspectos. Las líneas de CMS se denominan también líneas femeninas.

- Un "mapa genético" es una descripción de una relación de unión genética entre loci en uno o más cromosomas (o grupos de unión) dentro de una especie dada, generalmente representada en una forma de diagrama o de tabla. El "mapeo genético" es el proceso de definir la relación de unión de los loci a través del uso de marcadores genéticos, las poblaciones que segregan los marcadores, y los principios genéticos estándar de la frecuencia de recombinación. Una "ubicación del mapa genético" es un punto de referencia en un mapa genético, relativo a los marcadores genéticos circundantes en el mismo grupo de unión, donde se puede encontrar un marcador específico. Por el contrario, un mapa físico del genoma se refiere a distancias absolutas (por ejemplo, medidas en pares de bases o fragmentos genéticos contiguos aislados y superpuestos, o cóntigos). Un mapa físico del genoma no tiene en cuenta el comportamiento genético (por ejemplo, las frecuencias de recombinación) de varios segmentos cromosómicos.

- Los términos "genéticamente unido" se refiere a loci genéticos que están en desequilibrio de unión y que están determinados estadísticamente a no clasificarse independientemente. Los loci unidos genéticamente se clasifican dependientemente del 51 % al 99 % del tiempo o cualquier valor de número entero entre ellos, preferentemente al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %.

- El término "homogeneidad" indica que los miembros de un grupo tienen el mismo genotipo en uno o más loci específicos. El término "heterogeneidad" indica que los individuos dentro del grupo difieren en el genotipo en uno o más loci específicos.

- 50 El término "homólogo" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que están derivadas de un gen ancestral común a través de procesos naturales o artificiales (por ejemplo, son miembros de la misma familia de genes), y por lo tanto comparten típicamente similitud de secuencia. Los ácidos nucleicos homólogos tienen a menudo una identidad de secuencia suficiente para que una de las secuencias o su complemento sea capaz de hibridarse selectivamente con la otra en condiciones de hibridación rigurosas. El término "se hibrida selectivamente" incluye referencia a la hibridación, en condiciones de hibridación rigurosas, de una secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia diana de ácidos nucleicos específica hasta un grado detectable mayor (por ejemplo, al menos 2 veces sobre el contexto) que su hibridación con secuencias de ácidos nucleicos no diana y a la exclusión sustancial de ácidos nucleicos no diana. Las secuencias de hibridación selectiva tienen al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia, a menudo al menos el 90 % de identidad de secuencia y pueden tener el 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia entre sí. Un ácido nucleico que exhibe al menos cierto grado de homología a un ácido nucleico de referencia puede ser único o idéntico al ácido nucleico de referencia o su secuencia complementaria.

- 65 El término "célula huésped" significa una célula que contiene un ácido nucleico heterólogo, tal como un vector, y apoya la replicación y/o expresión del ácido nucleico. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, de insecto, de anfibio o de mamífero. Preferentemente,

las células hospedadoras son células vegetales. En el contexto de la divulgación, una célula hospedadora particularmente preferida es una célula de girasol.

El término "intervalo" se refiere a un tramo lineal continuo de un ADN cromosómico con términos definidos por y que incluyen marcadores moleculares.

El término "introducido" cuando se refiere a un ácido nucleico heterólogo o aislado se refiere a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota donde se puede incorporar el ácido nucleico en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertido en un replicón autónomo o expresado de forma transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado). El término incluye dichos medios de introducción de ácidos nucleicos como "transfección", "transformación" y "transducción".

El término "introgresión" se refiere a la transmisión de un alelo deseado de un locus genético desde un contexto genético a otro. Por ejemplo, la introgresión de un alelo deseado en un locus específico puede ocurrir por medio de un cruce sexual entre dos plantas, donde una de las plantas tiene el alelo deseado dentro de su genoma. El alelo se introgressa en la progenie. En otro ejemplo, la transmisión de un alelo puede ocurrir mediante la recombinación entre dos genomas donantes *in vitro*, por ejemplo, en un protoplasto fusionado, donde uno de los protoplastos donantes tiene el alelo deseado en su genoma. El alelo deseado puede ser, por ejemplo, un transgén o un alelo seleccionado de un marcador o locus de rasgo cuantitativo.

El término "aislado" se refiere a material, tal como un ácido nucleico o una proteína, que está sustancialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con el mismo en su entorno de origen natural. El material aislado comprende opcionalmente el material no encontrado con el material en su entorno natural, por ejemplo, una célula. Además, si el material está en su entorno natural, tal como una célula, el material se coloca en una ubicación en la célula (por ejemplo, el genoma u orgánulo subcelular) no nativo a un material encontrado en este entorno. Por ejemplo, un ácido nucleico de origen natural (por ejemplo, un promotor) se considera que está aislado si se introduce mediante medios no naturales en un locus del genoma no nativo a ese ácido nucleico. Los ácidos nucleicos que están "aislados" como se define en el presente documento, también se denominan ácidos nucleicos "heterólogos".

"Línea" significa un grupo de plantas que son genéticamente homogéneas y presentan poca variación entre individuos, generalmente como resultado de varias generaciones de autopolinización. Asimismo, una línea puede incluir un grupo de plantas propagadas vegetativamente a partir de una única planta progenitora, utilizando una técnica de cultivo tisular o celular.

El término "desequilibrio de unión" se refiere a una segregación no aleatoria de loci genéticos. Esto implica que dichos loci están en una proximidad física suficiente a lo largo de una longitud de un cromosoma que tienden a segregarse entre sí, es decir, con una frecuencia mayor que la que ocurriría de forma aleatoria.

Los términos "marcador", "marcador molecular", y "locus marcador" se refieren a una secuencia de nucleótidos o producto codificado de la misma (por ejemplo, una proteína) que se usa como un punto de referencia al identificar un locus unido, tal como un locus de rasgo cuantitativo (QTL). Un marcador puede derivarse de una secuencia de nucleótidos genómica o de secuencias de nucleótidos expresadas o de un polipéptido codificado. El término puede referirse también a secuencias de ácidos nucleicos complementarias a, o que flanquean, las secuencias marcadoras, tales como los ácidos nucleicos utilizados como sondas o pares de cebadores capaces de amplificar la secuencia marcadora. Dicha secuencia de ácidos nucleicos o molécula que se puede utilizar para identificar la presencia de un locus marcador, por ejemplo, una sonda de ácidos nucleicos que es complementaria a una secuencia de locus marcador, puede denominarse también como "sonda marcadora". Como alternativa, en algunos aspectos, una sonda marcadora se refiere a una sonda de cualquier tipo que es capaz de distinguir (es decir, genotipo) el alelo particular que está presente en un locus marcador.

Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de ácidos nucleicos" se refieren a polímeros de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos monocatenarios o bicatenarios, o quimeras de los mismos. Como se usa en el presente documento, los términos pueden incluir de manera adicional o alternativa análogos de nucleótidos de origen natural que tienen la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales ya que se hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de una manera similar a la de los nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ácidos nucleicos péptidos). A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácidos nucleicos particular divulgada en el presente documento abarca opcionalmente las secuencias complementarias, además de la secuencia indicada explícitamente. El término "gen" se utiliza para referirse a, por ejemplo, un ADNc y un ARNm codificado por la secuencia genómica, así como a esa secuencia genómica.

"Planta o partes de la planta" se refiere a células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejido de células vegetales a partir de los que pueden regenerarse plantas, callos de plantas, agrupaciones de plantas y células vegetales que están intactos en plantas o partes de plantas tales como embriones, polen, óvulos, flores, hojas, vainas, tallos, raíces, puntas de raíces, anteras y semilla y harina de semillas.

Los términos "locus de rasgo cuantitativo" o "QTL" se refieren a un locus genético polimórfico con al menos dos alelos

que reflejan diferencialmente la expresión de un rasgo fenotípico distribuido de manera continua.

A efectos de la presente invención, "resistencia", "resistencia a orobanca" o resistencia a "*Orobanche*" se define como un atributo genéticamente controlado de las plantas de girasol que evita que una planta de orobanca parásita se fije a una planta de girasol y complete su ciclo de vida a través de la etapa reproductiva (con semilla). La resistencia puede resultar de una o más de varias respuestas planta-parásito, incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a: (1) falta de suficiente estímulo de germinación de semilla de orobanca de la planta de girasol (se supone que es un exudado químico de raíz); (2) bloqueo de la penetración haustorial de orobanca de la superficie de la raíz de girasol; o (3) bloqueo de la conexión haustorial de orobanca al sistema vascular de la planta de girasol.

El término "recombinante" indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o proteína) se ha alterado sintéticamente (de manera no natural) por la intervención humana. La alteración para producir el material sintético puede realizarse en el material dentro de o eliminado de su entorno o estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico de origen natural se considera un ácido nucleico recombinante si se altera, o si se transcribe de ADN que haya sido alterado, por medio de la intervención humana realizada dentro de la célula de la cual se origina. Véase, por ejemplo, Compounds and Methods for Site Directed Mutagenesis in Eukaryotic Cells, Kmiec, patente de EE. UU. n.º 5.565.350; *In Vivo* Homologous Sequence Targeting in Eukaryotic Cells; Zarleng, et al., PCT/US93/03868.

"Línea restauradora" significa una línea que posee el gen o genes para restaurar la fertilidad masculina o la viabilidad del polen para un híbrido de girasol o línea consanguínea que tiene un citoplasma materno que condiciona la esterilidad masculina. Este término se describe también en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Fick, "Breeding and Genetics," en *Sunflower Science and Technology* 279-338 (J.F. Carter, ed., 1978).

"Selección" significa la extracción de un fenotipo deseado de un amplio grupo de fitomejoramiento genéticamente heterogéneo, denominado comúnmente población. Las plantas individuales dentro de la población se seleccionan para las manifestaciones preferidas de dichos rasgos como morfología de la planta, morfología de la flor, resistencia a insectos o enfermedades, madurez y productividad.

Los términos "repetición de secuencia simple" o "SSR" se refieren a un tipo de marcadores moleculares (también conocidos como microsatélite) basados en secuencias cortas de nucleótidos (2-6 unidades de longitud) que se repiten en tándem. Por ejemplo, una repetición de dinucleótido podría ser GAGAGAGA y una repetición de trinucleótido podría ser ATGATGATGATG. Se cree que cuando el ADN se replica, suceden errores en el proceso y se agregan conjuntos adicionales de estas secuencias repetidas a la cadena. Con el tiempo, estas secuencias repetidas varían en longitud entre un cultivar y otro. Un ejemplo de una variación alélica en SSR sería: Alelo A: GAGAGAGA (4 repeticiones de la secuencia GA) y Alelo B: GAGAGAGAGAGA (6 repeticiones de la secuencia GA). Estas variaciones de longitud son fáciles de trazar en el laboratorio y permiten el seguimiento de la variación genotípica en los programas de fitomejoramiento.

Los términos "polimorfismo de un solo nucleótido" o "SNP" se refieren a una alteración de un solo nucleótido en la secuencia genómica. Esto puede suceder cuando una sola adenina, timina, citosina o guanina (representadas por A, T, C, o G) se cambia a uno cualquiera de los otros cuatro nucleótidos, o cuando un solo nucleótido se inserta o elimina. El SNP puede o no dar como resultado un cambio funcional del gen.

Los términos "planta transgénica" se refieren a una planta que comprende dentro de su genoma un polinucleótido heterólogo. En general, el polinucleótido heterólogo se integra de manera estable dentro del genoma de modo que el polinucleótido pase a las generaciones sucesivas. El polinucleótido heterólogo puede estar integrado en el genoma solo o como una parte de un casete de expresión recombinante. "Transgénico" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de planta o planta, cuyo genotipo se ha alterado por la presencia de ácido nucleico heterólogo que incluye aquellos organismos o células transgénicos inicialmente tan alterados, así como aquellos que se crean por propagación sexual o asexual del organismo o célula transgénicos iniciales y retienen el ácido nucleico heterólogo. El término "transgénico" como se usa en el presente documento no abarca la alteración del genoma (cromosómico o extracromosómico) mediante métodos convencionales de fitomejoramiento de plantas (es decir, cruces) o eventos de origen natural tales como la fertilización cruzada aleatoria, la infección vírica no recombinante, la transformación bacteriana no recombinante, la transposición no recombinante o la mutación espontánea.

"Variedad" o "cultivar" se refiere a un grupo de plantas dentro de las especies (por ejemplo, *Helianthus annuus*) que comparten ciertas características constantes que las separan de la forma típica y de otras variedades posibles dentro de esas especies.

Los cultivos de campo se cultivan a través de técnicas que aprovechan el método de polinización de la planta. Una planta se autopoliniza si el polen de una flor se transfiere a la misma o a otra flor de la misma planta o una planta genéticamente idéntica. Una planta se autopoliniza si el polen proviene de una flor en una planta genéticamente diferente. De esta manera, el término "autopolinizado" en un programa de fitomejoramiento se refiere a la autopolinización y el término "cruzado" se refiere a la polinización cruzada.

Los girasoles tienen una inflorescencia de tipo cabezuela con flores de rayos estériles y flores de disco perfectas (que tienen estambre y pistilo). En su estado silvestre, el girasol ha sido autoestéril o autoincompatible de modo que es un cultivo altamente polinizante cruzado que depende en gran medida de las abejas o de otros insectos para la polinización. La mayoría de las áreas de producción no tienen una población de abejas suficiente para polinizar de manera adecuada el cultivo. Esto ha dado como resultado una selección del fitomejorador para autocompatibilidad o autofertilidad que aumenta el rendimiento de las semillas cuando hay unas pocas abejas presentes.

Una población de fitomejoramiento del girasol debería ser sustancialmente homogénea y reproducible para ser útil sea en el fitomejoramiento adicional o en el desarrollo de un cultivar comercial. Existe un número de métodos analíticos disponibles para determinar la estabilidad fenotípica de una población de girasoles.

El método más antiguo y más tradicional de análisis es la observación de los rasgos fenotípicos. Los datos se recogen normalmente en experimentos de campo a lo largo de la vida de las plantas de girasol que se deben examinar. Las características fenotípicas se observan muy a menudo para rasgos asociados con el rendimiento de las semillas, el contenido de aceite de semillas, el contenido de proteínas de las semillas, la composición de ácidos grasos del aceite, el contenido de glucosinolato de la harina, el hábito de crecimiento, la resistencia al encamado, la altura de la planta, la resistencia a la rotura, etc. Otras características fenotípicas observadas incluyen resistencia a enfermedades o insectos y tolerancia a los herbicidas.

Se ha descubierto que las composiciones y métodos divulgados en el presente documento pueden ser útiles para identificar líneas nuevas de girasoles resistentes a *Orobanche cumana*.

Una semilla de *Orobanche* próxima a la zona de la raíz de una variedad susceptible germinará, formará un haustorio en la raíz de la planta susceptible y completará su ciclo de vida extrayendo el sustrato de la planta hospedadora, provocando de este modo un grave perjuicio para el crecimiento y la productividad de la planta hospedadora. Véase, por ejemplo, Dominguez, (1996) Plant Breed. 115:203-204; Ish-Shalom-Gordon, et al., (1993) Phytopathology 83:1250-1252; Kirichenko, et al., (1987) Plant Breed. Abstr. 57:1392; Melero-Vara, et al. (2000), Helia 23:45-56; y Sukno, et al., (1999) Crop Sci. 39:674-678). La resistencia del Sistema 1 a *Orobanche cumana* da como resultado un fallo de una semilla de *Orobanche* en la zona de la raíz de una variedad resistente para infectar la planta hospedadora. Esta forma de resistencia está representada en la línea del girasol U00S9LM y nº de acceso ATCC PTA-3793.

A diferencia del caso de la resistencia del Sistema 1, Una semilla de *Orobanche cumana* en la zona de la raíz de las plantas de girasol que llevan el gen de resistencia del Sistema 2 germinará, penetrando en los tejidos de la raíz hospedadora y formando un haustorio. Los brotes de orobancha comenzarán a desarrollarse bajo tierra. Sin embargo, para las plantas de girasol con el gen de resistencia del Sistema 2, la planta de *Orobanche* invasora se marchitará y morirá antes de que emerja del suelo, incapaz de completar su ciclo de vida en el sistema de raíces de la planta resistente. Esta forma de resistencia está representada en la línea del girasol 8556UG y nº de acceso ATCC PTA-3792; véase, el documento WO 2003/073837. En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona marcadores moleculares para un gen que proporciona resistencia del Sistema 2 a *Orobanche cumana*.

Un tercer mecanismo combina las fuentes de resistencia de ambos sistemas para crear una resistencia más fuerte. Esta forma de resistencia está representada en el híbrido de girasol 01UL2365 y nº de acceso ATCC PTA-3791. La resistencia a orobancha se refuerza combinando el rasgo de resistencia del Sistema 2 con otros genes de resistencia.

En el pasado, los fitomejoradores han tenido que confiar en un bioensayo para seleccionar plantas resistentes, buscando orobancha viva dentro de un radio de 50 cm alrededor de cada planta y comprobando bajo tierra cualquier raíz de orobancha fijada al sistema de raíces. Este es un método muy tedioso y puede ser impreciso debido a los efectos medioambientales. Un marcador molecular asociado con el alelo de resistencia del gen de resistencia del Sistema 2 permitiría a los fitomejoradores seleccionar de manera más rápida y más fiable las plantas resistentes durante el proceso de fitomejoramiento.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona marcadores moleculares para resistencia del Sistema 2 a *Orobanche cumana*. Anteriormente, ningún marcador molecular había estado disponible para identificar o diferenciar la resistencia del Sistema 2 a *Orobanche* en el girasol. Los fitomejoradores de girasoles han tenido que confiar en las observaciones de campo cuando incorporan genes de resistencia del Sistema 2 a *Orobanche* en sus poblaciones de fitomejoramiento. Los nuevos marcadores moleculares facilitan los esfuerzos de los fitomejoradores de girasoles. Por ejemplo, el uso de los marcadores permite a los fitomejoradores:

- 1) Diferenciar entre plantas dentro de una población de fitomejoramiento de segregación para identificar aquellos que llevan el gen de resistencia del Sistema 2.
- 2) Producir resistencia del Sistema 2 en líneas consanguíneas de élite que contenían anteriormente poca o ninguna resistencia a *Orobanche*, aumentando de este modo la diversidad de los productos de girasol disponibles para los cultivadores en áreas infestadas con *Orobanche*.
- 3) Combinar el gen del Sistema 2 con otros genes de resistencia, para desarrollar plantas que contienen tanto resistencia del Sistema 1 como del Sistema 2 y de este modo proporcionan una combinación de resistencia que es superior a la resistencia del Sistema 1 o Sistema 2 sola.

4) Combinar el gen del Sistema 2 con genes que proporcionan otros rasgos útiles, como la resistencia a otros parásitos o enfermedades que afectan al girasol, o tolerancia a herbicidas.

5) Crear nuevos productos comerciales que pueden utilizarse para agotar los bancos de semillas de *Orobanche* existentes en el perfil del suelo y limitar nuevos depósitos de semillas de *Orobanche* en un sistema de cultivo.

6) Identificar regiones y/o agrupaciones de genes en el genoma del girasol que dan lugar a la resistencia a *Orobanche* en el girasol y clonar los genes útiles a partir de estos loci para el desarrollo de marcadores adicionales o el desarrollo de nuevas construcciones de transgenes que se pueden utilizar para desarrollar girasoles transgénicos con resistencia a *Orobanche*.

Las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento pueden ayudar a crear de manera reproducible líneas de girasol que expresan el rasgo de resistencia a *Orobanche* dentro de un contexto fenotípico consistente que exhibe uno o más rasgos deseables tales como alto rendimiento de semillas, madurez temprana, tolerancia a la sequía, tolerancia al frío, contenido de proteínas de las semillas adecuado y composición de aminoácidos, enanismo, resistencia al encamado, resistencia a insectos o enfermedades provocadas por bacterias, hongos, o virus, y tolerancia al tratamiento con herbicidas.

Desarrollo híbrido en girasol

La semilla de girasol híbrida se produce típicamente por un sistema de esterilidad masculina que incorpora consanguinidades genéticas o estériles masculinas citoplásmicas (CMS por sus siglas en inglés). Las plantas de una consanguinidad CMS son estériles masculinas como resultado de factores que resultan del genoma citoplásmico, en oposición al nuclear. Por lo tanto, esta característica se hereda exclusivamente a través del progenitor femenino, puesto que solo la hembra proporciona citoplasma a la semilla fertilizada. CMS pueden derivar de líneas de girasol conocidas en la técnica y disponibles públicamente como CMS HA89 (USDA). La fuente de CMS HA89 es el material de Leclercq, "Cytoplasmic Sterility in the Sunflower," (1969) Ann. Amelior Plant 19:99-106.

Las plantas de CMS se fertilizan con polen de otra planta que no es estéril masculina. El polen de la segunda planta puede o no contribuir con los genes que hacen las plantas de la progenie fértiles masculinas.

Las líneas estériles masculinas citoplásmicas se desarrollan tradicionalmente por el método de retrocruzamiento en el que las líneas deseables que han sufrido consanguinidad y selección en varias generaciones se cruzan inicialmente con esterilidad masculina citoplásmica. A partir de entonces, la línea consanguínea deseable se utiliza como un progenitor recurrente en el procedimiento de retrocruzamiento. La progenie final será genéticamente similar al progenitor recurrente a excepción de que será estéril masculina.

Las líneas restauradoras de la fertilidad pueden desarrollarse utilizando el retrocruzamiento para transferir un gen restaurador dominante a una línea consanguínea establecida con citoplasma normal. Si se utiliza este procedimiento, las plantas seleccionadas deben cruzarse con una línea estéril masculina citoplásmica después de cada generación para determinar si los genes restauradores de la fertilidad están presentes. Un procedimiento más común es la autopolinización y la selección de plantas fértiles masculinas a partir de híbridos comerciales o cruces planificados de progenitores que tienen genes restauradores en el citoplasma estéril masculino. Este procedimiento no requiere una prueba del cruzamiento con una línea estéril masculina durante la selección porque las plantas serán completamente fértiles masculinas si los genes restauradores necesarios están presentes.

Una línea restauradora adecuada para CMS puede producirse mediante el cruzamiento con cualquiera de las líneas restauradoras comúnmente disponibles, tales como RHA274, RHA271, y RHA273 (USDA), u otras líneas que poseen genes para la restauración de la fertilidad masculina. Las líneas y variedades derivadas de esta manera que producen semillas que tienen resistencia a *orobanche* y que son verdaderos fitomejoradores para al menos los genes restauradores de la fertilidad, pueden aislarse mediante autopolinización continua y cruzarse con las líneas CMS resistentes a *orobanche* descritas previamente.

Desarrollo consanguíneo en girasol

El uso de consanguinidades estériles masculinas es solo un factor en la producción de híbridos de girasol. El desarrollo de híbridos de girasol requiere, en general, el desarrollo de líneas consanguíneas homocigóticas, el cruzamiento de estas líneas y la evaluación de la progenie. Los métodos de fitomejoramiento por pedigrí y de fitomejoramiento por selección recurrente se utilizan para desarrollar líneas consanguíneas de poblaciones de fitomejoramiento. Los programas de fitomejoramiento combinan los contextos genéticos de dos o más líneas consanguíneas o varias otras fuentes de base amplia en grupos de fitomejoramiento a partir de los cuales se desarrollan nuevas líneas consanguíneas por autofertilización y selección de los fenotipos deseados. Las nuevas consanguinidades se cruzan con otras líneas consanguíneas, y los híbridos de estos cruces se evalúan para su potencial comercial.

El fitomejoramiento del pedigrí se utiliza comúnmente para la mejora de los cultivos. El fitomejoramiento del pedigrí comienza con el cruzamiento de dos genotipos, cada uno de los cuales puede tener una o más características deseables que faltan en el otro o que complementan al otro. Si los dos padres originales no proporcionan todas las características deseadas, se pueden incluir padres adicionales en el esquema de cruzamiento.

Estos padres se cruzan de una manera simple o compleja para producir una F1. Una población F2 se produce por autofertilización de una o varias F1 o mediante entrecruzamiento de dos F1 (es decir, apareamiento de hermanos). La selección de los mejores individuos puede comenzar en la población F2. Comenzando en la F3, se seleccionan las mejores familias, y los mejores individuos dentro de las mejores familias. Las pruebas replicadas de familias (líneas) puede comenzar en la generación de F4 para mejorar la efectividad de la selección de rasgos con baja heredabilidad. En una etapa avanzada de consanguinidad (es decir, F6 y F7), las mejores líneas o mezclas de líneas fenotípicamente similares se evalúan comúnmente por su liberación potencial como nuevos cultivos.

Las variedades mejoradas también se pueden desarrollar a través de selección recurrente. Una población genéticamente variable de individuos heterocigotos se identifica o se crea por entrecruzamiento de varios padres diferentes. Las mejores plantas se seleccionan basándose en la superioridad individual, la progenie sobresaliente, y/o la capacidad de combinación excelente. Las plantas seleccionadas se entrecruzan para producir una nueva población en la que se continúan ciclos adicionales de selección.

El objetivo de los programas de desarrollo de híbridos de girasol comerciales es desarrollar nuevas líneas consanguíneas que se combinen para producir híbridos con alta productividad y rendimiento agronómico superior. La productividad es el rasgo primario que buscan los fitomejoradores. Sin embargo, muchos otros rasgos agronómicos fundamentales son importantes en las combinaciones de híbridos y tienen un impacto en la productividad o, por el contrario, proporcionan un rendimiento superior en las combinaciones de híbridos. Los objetivos fundamentales en el fitomejoramiento del girasol incluyen una productividad de semillas mejorada, un porcentaje de aceite de semillas mejorado o una calidad de aceite, madurez más temprana, altura de la planta más baja, uniformidad del tipo de planta y resistencia a enfermedades o insectos. Además, las líneas per se tienen preferentemente un rendimiento aceptable para los rasgos parentales tales como la productividad de semillas y la producción de polen, todos los cuales afectan a la capacidad de proporcionar líneas parentales en cantidad y calidad suficientes para la hibridación. Estos rasgos han demostrado estar bajo el control genético y muchos, si no todos, los rasgos están afectados por genes múltiples.

A través de técnicas de fitomejoramiento, se puede combinar o "apilar" la resistencia mejorada a *Orobanche cumana* con cualquier otro rasgo deseable de semillas, agronómico, o de resistencia a insectos o enfermedades. Los ejemplos de otros rasgos deseables incluyen, pero no se limitan a, un perfil o contenido de aceite de semillas alterado, alta productividad de semillas, madurez más temprana, tolerancia a la sequía, tolerancia al frío, mayor contenido de proteínas de las semillas, modificación de la composición del contenido de aminoácidos en las semillas, enanismo, resistencia al encamado, resistencia a insectos o enfermedades provocadas por bacterias, hongos, o virus, o tolerancia al tratamiento con herbicidas.

Los métodos divulgados en el presente documento encuentran un uso particular en los programas de fitomejoramiento con líneas de girasol tolerantes a herbicida con sulfonilurea. Los herbicidas con sulfonilurea se han encontrado efectivos contra las malezas parásitas del girasol tales como la cuscuta y las especies de *Orobanche* (L. Garcia-Torres, et al., (1994) Weed Research 34:395-402).

Regeneración de plantas

Esta divulgación también se refiere a las partes de las plantas divulgadas en el presente documento, incluyendo células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejido de células vegetales a partir de los que pueden regenerarse plantas de girasol, callos de plantas, agrupaciones de plantas y células vegetales que están intactos en plantas o partes de plantas tales como embriones, polen, óvulos, flores, hojas, vainas, tallos, raíces, puntas de raíces, anteras y semilla y harina de semillas.

Las plantas producidas de acuerdo con la presente divulgación pueden regenerarse a partir de partes de plantas que utilizan técnicas conocidas. Por ejemplo, las semillas de las plantas divulgadas en el presente documento pueden plantarse de acuerdo con los procedimientos de cultivo de girasoles convencionales. Estas plantas generarán semillas adicionales.

Las plantas de girasol pueden generarse también utilizando el cultivo y la regeneración de tejidos. El cultivo de varias células y tejidos de girasol y la regeneración de plantas del mismo es conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la propagación de girasol mediante el cultivo de tejidos se describe en las siguientes referencias: Henderson, et al, (1952) "The culture of normal sunflower stem callus.", Am. J. Bot. 39:444-451; Levine, M., (1951) "Response of fibrous roots of sunflower and tobacco tissue cultures to plant growth substances", Bot. Gaz. 112:281-289; Henrickson, C.E., (1954) "The flowering of sunflower explants in aseptic culture", Plant Physiol. 29:536-538; y Sadhu, M. K., (1974) "Effect of different auxins on growth and differentiation in callus tissue from sunflower stem pith", Indian J. Exp. Biol. 12:110-111.

Aceite y harina vegetal

La semilla de las plantas divulgadas en el presente documento puede utilizarse para producir aceite y harina vegetal. La semilla de estas variedades, la planta producida a partir de dicha semilla, la planta de girasol híbrida producida a partir del cruzamiento de estas variedades con otras variedades, la semilla híbrida resultante y varias partes de la

planta híbrida de girasol pueden utilizarse en la producción de un aceite vegetal comestible u otros productos alimentarios de acuerdo con las técnicas conocidas.

Las unidades, prefijos, y símbolos se indican en su forma aceptada del Sistema Internacional de Unidades (SI). A menos que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi. Los intervalos numéricos indicados en la memoria descriptiva incluyen los números que definen el intervalo e incluyen cada número entero dentro del intervalo definido. Se puede hacer referencia a los nucleótidos en el presente documento por sus símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura IUPAC-IUBMB. Los términos definidos en el presente documento se definen de manera más completa por referencia a la memoria descriptiva como un todo.

Los siguientes Ejemplos se presentan como ilustraciones específicas de la invención reivindicada. Debería entenderse, sin embargo, que la invención no está limitada a los detalles específicos expuestos en los Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cribado de campo

El cribado de la nueva fuente de germoplasma de fitomejoramiento y líneas consanguíneas para la resistencia a orobanca se realizó durante varios años en el vivero de verano en Ahmetbey, Luleburgaz-Kirklari, Turquía. El vivero estaba infestado artificialmente con semillas de nuevas razas de *O. cumana*. La infestación del suelo del vivero se repitió cada año. El cribado se realizó plantando 15 plantas en una longitud de fila de 4 metros para cada selección del germoplasma de fitomejoramiento y líneas consanguíneas. Se evaluó la resistencia a orobanca justo antes de la cosecha retirando las plantas del suelo y contando el número de plantas de girasol con brotes muertos de orobanca fijados al sistema de raíces del girasol debajo de la superficie del suelo. Se encontró que las plantas resistentes del Sistema 2 tenían brotes primarios muertos de orobanca fijados a sus sistemas de raíces debajo del suelo. Las líneas susceptibles a orobanca se infectaron con brotes de orobanca que emergieron del suelo. Las plantas susceptibles mostraron diferentes grados de intensidad de ataque de orobanca.

Ejemplo 2: Mapeo molecular del QTL que confiere resistencia del sistema 2 a orobanca

Un enfoque para determinar qué alelos desempeñan un papel en un rasgo fenotípico es comparar las cepas de plantas con fenotipos altamente divergentes para el rasgo de interés. Las distribuciones de alelos para una base de datos entera de marcadores se analizan para los dos grupos fenotípicos. Por ejemplo, una prueba de "Distribución de alelos intergrupales" puede realizarse utilizando el software GeneFlow™ versión 7.0 (GENEFLOW, Inc., Alexandria, Virginia). Un análisis de la frecuencia de alelos intergrupales proporciona un método para encontrar distribuciones no aleatorias de alelos entre dos grupos fenotípicos. Durante el procesamiento, una tabla de contingencia de frecuencias de alelos se construye y a partir de ella se calculan una estadística G y probabilidad (la estadística G se ajusta utilizando la corrección de William). El valor de probabilidad se ajusta para tener en cuenta el hecho de que se están realizando múltiples pruebas (por lo tanto, existe algún índice esperado de falsos positivos). La probabilidad ajustada es proporcional a la probabilidad de que las diferencias observadas de la distribución de alelos entre las dos clases se produzcan solo por casualidad. Cuanto más bajo es el valor de probabilidad, más significativa es la asociación entre el genotipo marcador en ese locus y el fenotipo de interés, en este caso, el fenotipo de resistencia a *Orobanche*. Una descripción más completa de la derivación de los valores de probabilidad puede encontrarse en la documentación del software GeneFlow™ versión 7.0. Véase también, Sokal y Rolf (1981), Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research, 2ª ed., San Francisco, W. H. Freeman and Co. En este análisis, las probabilidades ajustadas inferiores a 0,05 se consideran significativas (el marcador y el fenotipo muestran desequilibrio de unión), y las probabilidades ajustadas inferiores a aproximadamente 0,01 se consideran altamente significativas. Todas las clases de alelos representadas por menos de un número mínimo de observaciones a través de ambos grupos no se incluyen en el análisis estadístico.

La lógica subyacente es que los marcadores con distribuciones de alelos significativamente diferentes entre los grupos resistentes y susceptibles pueden asociarse con el rasgo y pueden utilizarse para diferenciarlos. El presente análisis examinó un locus marcador cada vez y determinó si la distribución de alelos dentro del grupo tolerante era significativamente diferente de la distribución de alelos dentro del grupo susceptible. Una distribución de alelos estadísticamente diferente es una indicación de que el marcador está unido a un locus que está asociado con la resistencia a *Orobanche*.

Para identificar los loci marcadores genéticos del girasol asociados con la resistencia a *Orobanche*, el mapeo de una población de 182 líneas de girasoles F2:3 se derivó del cruce de U0151LG (progenitor resistente) X E0005LG (progenitor susceptible). La resistencia o susceptibilidad de las líneas progenitoras se habían determinado anteriormente. Se aisló el ADN genómico de las plantas progenitoras y de la progenie y se analizaron en reacciones PCR utilizando cebadores de amplificación públicamente disponibles específicos para un gran número de marcadores SSR que cubrieron colectivamente todos los cromosomas en el genoma del girasol. Las plantas de la progenie y progenitoras se puntuaron también en el campo para la resistencia a *Orobanche*. Como resultado de este análisis, un supuesto locus para la resistencia del sistema 2 a orobanca de raza H se mapeo para el grupo 4 de unión (LG-04) del

mapa de consenso de girasol público, aproximadamente 3 cM de SSR HT0664-CA (Wills, D.M. y Burke, J.M. (2007) Genetics 176:2589-2599). Véase la figura 1.

5 Para saturar la región con más marcadores a partir del mapa de unión de referencia del girasol (Yu, J., et al., (2003) Crop Science 43:367-387; Gentzbittel, L., et al., (1999) Theor Appl Gen 99:218-234), se identificaron dos marcadores SNP como marcadores potenciales de interés, HT0183 y HT090 (Lai, et al., (2005) Theor.Appl.Gen. 11:1532-1544; Perez-Vich, B. (2004) Theor Appl Gen. 109:92-102). Véase la figura 2. Se diseñaron los cebadores (SEQ ID NOS: 5 y 6) que podrían servir para amplificar un fragmento de aproximadamente 278 bp, y se ejecutó la PCR en dos líneas parentales, U0151LG y E0005LG, así como U01P6LM y una cuarta línea. Se amplificó un producto de PCR en cada una de las cuatro líneas utilizando el par de cebadores HT183-F1/HT183-R1. Las secuencias resultantes de estas cuatro bandas indicaron que hay tres loci marcadores SNP potencialmente verdaderos. Estos tres SNP están marcados con asteriscos en el alineamiento proporcionado como figura 3.

15 A continuación, se diseñó un ensayo TAQMAN® (Roche Molecular Systems, Inc.) y se implementó para la detección del SNP HT183 utilizando los cebadores de las SEQ ID NOS: 3 y 4. La asociación del SNP HT183 con resistencia a BRSII se validó utilizando muestras de líneas de fitomejoramiento con fenotipos de resistencia a enfermedades conocidos. El resultado del genotipado fue consistente con el resultado observado del campo en el 98,2 % de las muestras (N=167). El locus SNP HT183 se mapeó hasta una ubicación de 1 cM de distancia desde el locus QTL previamente identificado para la resistencia a *Orobanche* en grupo de unión 4.

20 Las 167 progenies se seleccionaron de las cinco poblaciones enumeradas en la figura 4.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Pioneer Hi-Bred International, Inc.

<120> Marcadores genéticos para resistencia a orobanca en girasoles

30 <130> 2316-PCT

<150> 60/882,279

<151> 28-12-2006

35 <160> 10

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

<210> 1

<211> 278

40 <212> ADN

<213> Helianthus annuus

<400> 1

atcaaccgc	agtgaaccgc	caaggggtca	gattcacggg	ttccgtatgg	ctttatggta	60
tgaacactta	ggcatgctcg	acgacacttt	ccagaaccca	gaaagcaccg	agtgtgtgaa	120
aaaagttaac	cacatggccg	acaaatattg	ggaccttttc	gctagtgaag	atcttgaaca	180
agacctgccc	ggtcacttgc	ttcgttacc	gatcgggggt	gctagtgaag	gtaatgtgac	240
cgaactgccc	ggaaccgagt	ttttccctga	tacgaaa			278

45

<210> 2

<211> 278

<212> ADN

50 <213> Helianthus annuus

<400> 2

atcaaccgc	agtgaaccgc	caaggggtca	gattcacggg	ttccgtatgg	ctttatggta	60
tgaacactta	ggcatgctcg	acgacacttt	ccagaaccca	gaaaataaccg	agtgtgtgaa	120
aaaagttaac	cacatggccg	aaaaatattg	ggaccttttc	gctagtgaag	atcttgaaca	180
agacctgccc	ggtcacttgc	ttcgttacc	gatcgggggt	gctagtgaag	gtaatgtgac	240
cgaactgccc	ggaaccgagt	ttttccctga	tacgaaa			278

55

<210> 3

<211> 16

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> BRSII-Marcador n.º 1 - Sonda 1

 <400> 3
 acccagaaag caccga 16

 10 <210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> BRSII-Marcador n.º 1 - Sonda 2

 <400> 4
 20 acccagaaaa taccgag 17

 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> BRSII-Marcador n.º 1 - cebador directo

 <400> 5
 30 taggcatgct cgacgacact t 21

 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> BRSII-Marcador n.º 1 - cebador inverso

 <400> 6
 40 tatttgcgg ccatgtggtt aac 23

 <210> 7
 <211> 17
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> BRSII Marcador n.º 2 Sonda-Susceptible

 <400> 7
 50 tccaatatt tgcggc 17

 <210> 8
 55 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> BRSII Marcador n.º 2 Sonda-Resistente

 <400> 8
 tccaatatt ttgcggcca 19

 65 <210> 9

ES 2 711 627 T3

<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> BRSII Marcador n.º 2 Cebador inverso

 <400> 9
10 accgagtggtg tgaaaaaagt taacc 25

 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> BRSII Marcador n.º 2 Cebador directo

 <400> 10
20 tgttcaagat tctcactagc gaaaa 25

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una planta de girasol o germoplasma de girasol que tiene un fenotipo de resistencia del Sistema II a *Orobanche*, que comprende detectar en una planta de girasol o germoplasma de girasol al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) de un locus marcador que está asociado con dicho fenotipo, en donde el locus marcador está representado por la SEQ ID NO: 2 o presenta una frecuencia de recombinación inferior al 5 % con respecto al locus marcador de la SEQ ID NO: 2 y mapea para el grupo de unión 4.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la detección comprende amplificar el locus marcador o una parte del locus marcador y detectar el amplicón marcador amplificado resultante.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la amplificación comprende:
 - (a) mezclar un cebador de amplificación o un par de cebadores de amplificación con un ácido nucleico aislado de la planta o germoplasma de girasol, en donde el cebador o el par de cebadores es complementario o parcialmente complementario de al menos una parte del locus marcador, y es capaz de iniciar la polimerización del ADN mediante una ADN polimerasa utilizando el ácido nucleico del girasol como molde; y
 - (b) extender el cebador o par de cebadores en una reacción de polimerización de ADN que comprende una ADN polimerasa y un ácido nucleico molde para generar al menos un amplicón.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el cebador o par de cebadores se selecciona de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 9 y 10.
5. Uso de un marcador para generar marcadores adicionales para la resistencia a *Orobanche*; en donde dicho marcador es un marcador genético asociado con la resistencia del Sistema II a *Orobanche* y mapeo para el grupo de unión 4 de *Helianthus annuus*, comprendiendo dicho marcador la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o una variante que retiene al menos uno de los polimorfismos de la SEQ ID NO: 2 con respecto a la SEQ ID NO: 1.
6. Un método para identificar genes o agrupaciones de genes en el genoma del girasol que dan lugar a la resistencia a *Orobanche*, comprendiendo amplificar una región cromosómica identificada por hibridación a un cebador seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 9, o 10, y comprendiendo además opcionalmente rondas sucesivas de cribado y aislamiento de clones para construir un cóntigo que comprende un marco de lectura abierto.

FIGURA 1

LG-04

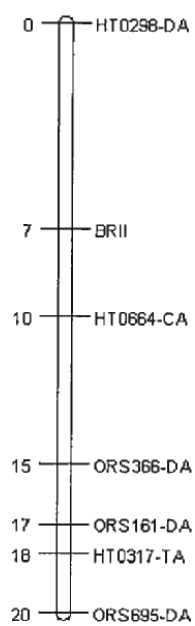


Figura 1. Ubicación de un gen de resistencia del sistema 2 a orobanca ("BR11" o "BRSII") posicionado en LG-04 en una población de mapeo F2:3 a partir del cruce de U0151LG x E0005LG.

FIGURA 2

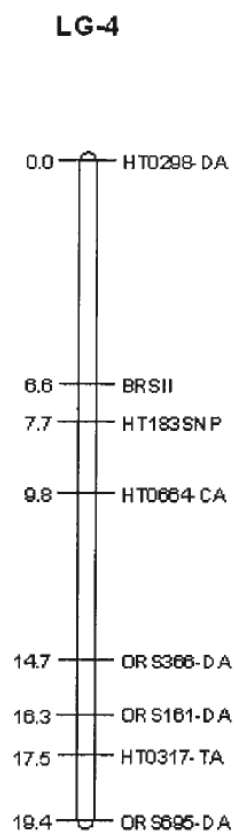


Figura 2. Ubicación del marcador SNP HT183 con referencia al gen de resistencia del sistema 2 a orobanca

FIGURA 3

Resultados BestFit
Resultados BestFit

BestFit de : BRSII-resistant_allele comprobación: 5999 de: 1 a: 278

WPDEF de CMI

a: BRSII-susc_allele comprobación: 5510 de: 1 a: 278

WPDEF de CMI

Tabla de comparación de símbolos : swgapdna.cmp CompCheck: 2335

Peso de hueco :	50	Promedio de coincidencia:	0.000
Peso de longitud :	3	Promedio de no coincidencia:	00

Calidad :	2723	Longitud :	278
Proporción :	9.795	Huecos :	0
Porcentaje de similitud:	98.921	Porcentaje de identidad:	8.921

Umbral de presentación de coincidencia para el(los) alineamiento(s):

	=	.IDENTIDAD
:	=	5
.	=	1

BRSII-resistant_allele x BRSII-susc_allele 27 de diciembre de 2006 17:08

..

```

      1 ATCAACCCGAGTGAACCCGCAAGGGGTCAGATTACGGGTTCCGTATGG 50
      |||
      1 ATCAACCCGAGTGAACCCGCAAGGGGTCAGATTACGGGTTCCGTATGG 50

51 CTTTATGGTATGAACACTTAGGCATGCTCGACGACACTTCCAGAACCCA 100
   |||
51 CTTTATGGTATGAACACTTAGGCATGCTCGACGACACTTCCAGAACCCA 100

      ** . . . . *
101 GAAAATACCGAGTGTGTGAAAAAGTTAACCACATGGCCGAAAAATATTG 150
   ||| |||
101 GAAAGCACCGAGTGTGTGAAAAAGTTAACCACATGGCCGACAAATATTG 150

151 GGACCTTTTCGCTAGTGAGAATCTTGAACAAGACCTGCCCGGTCACCTGC 200
   |||
151 GGACCTTTTCGCTAGTGAGAATCTTGAACAAGACCTGCCCGGTCACCTGC 200

201 TTCGTTACCCGATCGGGGTTGCTAGTGAAGGTAATGTGACCGAACTGCCC 250
   |||
201 TTCGTTACCCGATCGGGGTTGCTAGTGAAGGTAATGTGACCGAACTGCCC 250

251 GGAACCGAGTTTTTCCTGATACGAAAG 278
   |||
251 GGAACCGAGTTTTTCCTGATACGAAAG 278

```

Secuencia de entrada: BRSII-resistant_allele

ES 2 711 627 T3

```
!!NA_SEQUENCE 1.0
WPDEF de CMI
BRSII-resistant_allele Longitud : 278 28 de agosto de 2006 18:19 Tipo: N
comprobación: 5999 ..
```

```
1 ATCAACCCGC AGTGAACCCG CAAGGGGTCA GATTCACGGG TTCCGTATGG
51 CTTTATGGTA TGAACACTTA GGCATGCTCG ACGACACTTT CCAGAACCCA
101 GAAAATACCG AGTGTGTGAA AAAAGTTAAC CACATGGCCG AAAAATATTG
151 GGACCTTTTC GCTAGTGAGA ATCTTGAACA AGACCTGCCC GGTCAC TTGC
201 TTCGTTACCC GATCGGGGTT GCTAGTGAAG GTAATGTGAC CGAACTGCCC
251 GGAACCGAGT TTTCCCTGA TACGAAAG
```

Secuencia de entrada: BRSII-susc_allele

```
!!NA_SEQUENCE 1.0
WPDEF from CMI
BRSII-susc_allele Longitud : 278 28 de agosto de 2006 18:18 Tipo: N
Check: 5510 ..
```

```
1 ATCAACCCGC AGTGAACCCG CAAGGGGTCA GATTCACGGG TTCCGTATGG
51 CTTTATGGTA TGAACACTTA GGCATGCTCG ACGACACTTT CCAGAACCCA
101 GAAAGCACCG AGTGTGTGAA AAAAGTTAAC CACATGGCCG ACAAATATTG
151 GGACCTTTTC GCTAGTGAGA ATCTTGAACA AGACCTGCCC GGTCAC TTGC
201 TTCGTTACCC GATCGGGGTT GCTAGTGAAG GTAATGTGAC CGAACTGCCC
251 GGAACCGAGT TTTCCCTGA TACGAAAG
```

FIGURA 4**Población F2 adicional para desarrollo de marcador de resistencia del sistema 2**

Fuente	Pedigrí	Reacción de orobanca	Progenitores	
			Progenitor susceptible	Progenitor resistente
04UA4025-1	E0012LG/U0151LG)GUX1	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-2	E0012LG/U0151LG)GUX2	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-3	E0012LG/U0151LG)GUX3	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-4	E0012LG/U0151LG)GUX4	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-5	E0012LG/U0151LG)GUX5	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-6	E0012LG/U0151LG)GUX6	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-7	E0012LG/U0151LG)GUX7	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-8	E0012LG/U0151LG)GUX8	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-9	E0012LG/U0151LG)GUX9	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-A0	E0012LG/U0151LG)GUXA0	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-A1	E0012LG/U0151LG)GUXA1	Resistente	E0012LG	U0151LG
04UA4025-C1	E0012LG/U0151LG)GUXC1	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4025-C2	E0012LG/U0151LG)GUXC2	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4025-C3	E0012LG/U0151LG)GUXC3	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4025-C4	E0012LG/U0151LG)GUXC4	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4025-C5	E0012LG/U0151LG)GUXC5	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4025-C6	E0012LG/U0151LG)GUXC6	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4025-C7	E0012LG/U0151LG)GUXC7	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4025-C8	E0012LG/U0151LG)GUXC8	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4025-C9	E0012LG/U0151LG)GUXC9	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4025-D0	E0012LG/U0151LG)GUXD0	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4025-D1	E0012LG/U0151LG)GUXD1	Susceptible	E0012LG	U0151LG
04UA4026-1	N0241LG/U0151LG)GUX1	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-2	N0241LG/U0151LG)GUX2	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-3	N0241LG/U0151LG)GUX3	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-4	N0241LG/U0151LG)GUX4	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-5	N0241LG/U0151LG)GUX5	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-6	N0241LG/U0151LG)GUX6	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-7	N0241LG/U0151LG)GUX7	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-8	N0241LG/U0151LG)GUX8	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-9	N0241LG/U0151LG)GUX9	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-A0	N0241LG/U0151LG)GUXA0	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-A1	N0241LG/U0151LG)GUXA1	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-A2	N0241LG/U0151LG)GUXA2	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-A3	N0241LG/U0151LG)GUXA3	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-A4	N0241LG/U0151LG)GUXA4	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-A5	N0241LG/U0151LG)GUXA5	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-A6	N0241LG/U0151LG)GUXA6	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-A7	N0241LG/U0151LG)GUXA7	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-A8	N0241LG/U0151LG)GUXA8	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-A9	N0241LG/U0151LG)GUXA9	Resistente	N0241LG	U0151LG

04UA4026-B0	N0241LG/U0151LG)GUXB0	Resistente	N0241LG	U0151LG
04UA4026-C1	N0241LG/U0151LG)GUXC1	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-C2	N0241LG/U0151LG)GUXC2	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-C3	N0241LG/U0151LG)GUXC3	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-C4	N0241LG/U0151LG)GUXC4	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-C5	N0241LG/U0151LG)GUXC5	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-C6	N0241LG/U0151LG)GUXC6	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-C7	N0241LG/U0151LG)GUXC7	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-C8	N0241LG/U0151LG)GUXC8	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-C9	N0241LG/U0151LG)GUXC9	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-D0	N0241LG/U0151LG)GUXD0	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-D1	N0241LG/U0151LG)GUXD1	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-D2	N0241LG/U0151LG)GUXD2	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-D3	N0241LG/U0151LG)GUXD3	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4026-D4	N0241LG/U0151LG)GUXD4	Susceptible	N0241LG	U0151LG
04UA4028-1	N0244LG/U0151LG)GUX1	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-2	N0244LG/U0151LG)GUX2	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-3	N0244LG/U0151LG)GUX3	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-4	N0244LG/U0151LG)GUX4	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-5	N0244LG/U0151LG)GUX5	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-6	N0244LG/U0151LG)GUX6	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-7	N0244LG/U0151LG)GUX7	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-8	N0244LG/U0151LG)GUX8	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-9	N0244LG/U0151LG)GUX9	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-A0	N0244LG/U0151LG)GUXA0	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-A1	N0244LG/U0151LG)GUXA1	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-A2	N0244LG/U0151LG)GUXA2	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-A3	N0244LG/U0151LG)GUXA3	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-A4	N0244LG/U0151LG)GUXA4	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-A5	N0244LG/U0151LG)GUXA5	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-A6	N0244LG/U0151LG)GUXA6	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-A7	N0244LG/U0151LG)GUXA7	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-A8	N0244LG/U0151LG)GUXA8	Resistente	N0244LG	U0151LG
04UA4028-C1	N0244LG/U0151LG)GUXC1	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-C2	N0244LG/U0151LG)GUXC2	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-C3	N0244LG/U0151LG)GUXC3	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-C4	N0244LG/U0151LG)GUXC4	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-C5	N0244LG/U0151LG)GUXC5	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-C6	N0244LG/U0151LG)GUXC6	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-C7	N0244LG/U0151LG)GUXC7	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-C8	N0244LG/U0151LG)GUXC8	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-C9	N0244LG/U0151LG)GUXC9	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-D0	N0244LG/U0151LG)GUXD0	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-D1	N0244LG/U0151LG)GUXD1	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-D2	N0244LG/U0151LG)GUXD2	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-D3	N0244LG/U0151LG)GUXD3	Susceptible	N0244LG	U0151LG

04UA4028-D4	N0244LG/U0151LG)GUXD4	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-D5	N0244LG/U0151LG)GUXD5	Susceptible	N0244LG	U0151LG
04UA4028-D6	N0244LG/U0151LG)GUXD6	Susceptible	N0244LG	U0151LG

04UA4043-1	=IF2603G/U0151LG)GUX1	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-2	=IF2603G/U0151LG)GUX2	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-3	=IF2603G/U0151LG)GUX3	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-4	=IF2603G/U0151LG)GUX4	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-5	=IF2603G/U0151LG)GUX5	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-6	=IF2603G/U0151LG)GUX6	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-7	=IF2603G/U0151LG)GUX7	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-8	=IF2603G/U0151LG)GUX8	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-9	=IF2603G/U0151LG)GUX9	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-A0	=IF2603G/U0151LG)GUXA0	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-A1	=IF2603G/U0151LG)GUXA1	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-A2	=IF2603G/U0151LG)GUXA2	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-A3	=IF2603G/U0151LG)GUXA3	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-A4	=IF2603G/U0151LG)GUXA4	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-A5	=IF2603G/U0151LG)GUXA5	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-A6	=IF2603G/U0151LG)GUXA6	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-A7	=IF2603G/U0151LG)GUXA7	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-A8	=IF2603G/U0151LG)GUXA8	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-A9	=IF2603G/U0151LG)GUXA9	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-B0	=IF2603G/U0151LG)GUXB0	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-B1	=IF2603G/U0151LG)GUXB1	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-B2	=IF2603G/U0151LG)GUXB2	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-B3	=IF2603G/U0151LG)GUXB3	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-B4	=IF2603G/U0151LG)GUXB4	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-B5	=IF2603G/U0151LG)GUXB5	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-B6	=IF2603G/U0151LG)GUXB6	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-B7	=IF2603G/U0151LG)GUXB7	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-B8	=IF2603G/U0151LG)GUXB8	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-B9	=IF2603G/U0151LG)GUXB9	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-C0	=IF2603G/U0151LG)GUXC0	Resistente	INR2603B	U0151LG
04UA4043-C1	=IF2603G/U0151LG)GUXC1	Susceptible	INR2603B	U0151LG
04UA4043-C2	=IF2603G/U0151LG)GUXC2	Susceptible	INR2603B	U0151LG
04UA4043-C3	=IF2603G/U0151LG)GUXC3	Susceptible	INR2603B	U0151LG
04UA4043-C4	=IF2603G/U0151LG)GUXC4	Susceptible	INR2603B	U0151LG
04UA4043-C5	=IF2603G/U0151LG)GUXC5	Susceptible	INR2603B	U0151LG
04UA4043-C6	=IF2603G/U0151LG)GUXC6	Susceptible	INR2603B	U0151LG
04UA4043-C7	=IF2603G/U0151LG)GUXC7	Susceptible	INR2603B	U0151LG
04UA4043-C8	=IF2603G/U0151LG)GUXC8	Susceptible	INR2603B	U0151LG
04UA4043-C9	=IF2603G/U0151LG)GUXC9	Susceptible	INR2603B	U0151LG
04UA4043-D0	=IF2603G/U0151LG)GUXD0	Susceptible	INR2603B	U0151LG
04UA4042-1	=IF2603G/U0278LG)GUX1	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-2	=IF2603G/U0278LG)GUX2	Resistente	INR2603B	U0278LG

04UA4042-3	=IF2603G/U0278LG)GUX3	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-4	=IF2603G/U0278LG)GUX4	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-5	=IF2603G/U0278LG)GUX5	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-6	=IF2603G/U0278LG)GUX6	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-7	=IF2603G/U0278LG)GUX7	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-8	=IF2603G/U0278LG)GUX8	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-9	=IF2603G/U0278LG)GUX9	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-A0	=IF2603G/U0278LG)GUXA0	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-A1	=IF2603G/U0278LG)GUXA1	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-A2	=IF2603G/U0278LG)GUXA2	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-A3	=IF2603G/U0278LG)GUXA3	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-A4	=IF2603G/U0278LG)GUXA4	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-A5	=IF2603G/U0278LG)GUXA5	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-A6	=IF2603G/U0278LG)GUXA6	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-A7	=IF2603G/U0278LG)GUXA7	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-A8	=IF2603G/U0278LG)GUXA8	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-A9	=IF2603G/U0278LG)GUXA9	Resistente	INR2603B	U0278LG
04UA4042-C1	=IF2603G/U0278LG)GUXC1	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-C2	=IF2603G/U0278LG)GUXC2	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-C3	=IF2603G/U0278LG)GUXC3	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-C4	=IF2603G/U0278LG)GUXC4	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-C5	=IF2603G/U0278LG)GUXC5	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-C6	=IF2603G/U0278LG)GUXC6	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-C7	=IF2603G/U0278LG)GUXC7	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-C8	=IF2603G/U0278LG)GUXC8	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-C9	=IF2603G/U0278LG)GUXC9	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-D0	=IF2603G/U0278LG)GUXD0	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-D1	=IF2603G/U0278LG)GUXD1	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-D2	=IF2603G/U0278LG)GUXD2	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-D3	=IF2603G/U0278LG)GUXD3	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-D4	=IF2603G/U0278LG)GUXD4	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-D5	=IF2603G/U0278LG)GUXD5	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-D6	=IF2603G/U0278LG)GUXD6	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-D7	=IF2603G/U0278LG)GUXD7	Susceptible	INR2603B	U0278LG
04UA4042-D8	=IF2603G/U0278LG)GUXD8	Susceptible	INR2603B	U0278LG

169

Progenitores

03UA4897-1	N0241LG	Susceptible		
03UA4902-1	N0244LG	Susceptible		
03UA5038-2	INR2603B	Susceptible		
04UA4964-1	U0278LG	Resistente		
04UA4975-1	U0151LG	Resistente		
04UA5586-1	E0012LG	Susceptible		

ES 2 711 627 T3

Fuente	Pedigri	Progenitor susceptible	Progenitor resistente
04UA4025	E0012LG/U0151LG)GUX1	E0012LG	U0151LG
04UA4026	N0241LG/U0151LG)GUX1	N0241LG	U0151LG
04UA4028	N0244LG/U0151LG)GUX1	N0244LG	U0151LG
04UA4043	=IF2603G/U0151LG)GUX1	INR2603B	U0151LG
04UA4042	=IF2603G/U0278LG)GUX1	INR2603B	U0278LG