

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 864 573**

51 Int. Cl.:

A01H 5/08 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2005 E 10185198 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021 EP 2301327**

54 Título: **Plantas de *Capsicum* resistentes al PMMoV**

30 Prioridad:

01.10.2004 EP 04077744

06.10.2004 EP 04077768

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

14.10.2021

73 Titular/es:

MONSANTO INVEST B.V. (100.0%)

Leeuwenhoekweg 52

2661 CZ Bergschenhoek, NL

72 Inventor/es:

ALLERSMA, ANTON PIETER;

HOFSTEDE, RENÉ JOHANNES MARIA y

VREUGDENHIL, DIRK

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 864 573 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Plantas de *Capsicum* resistentes al PMMoV

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a marcadores, pares de cebadores y procedimientos para seleccionar plantas resistentes a enfermedades. Más específicamente, la presente invención se refiere a plantas de pimiento que son resistentes a patotipos específicos del *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV) y a procedimientos de producción de dichas plantas.

Antecedentes de la invención

15 *Capsicum* (familia *Solanaceae* o solanáceas) es un género de plantas, cuyos frutos dulces y aromáticos se utilizan como especias, verduras y medicamentos. El género comprende aproximadamente 40 especies. La mayoría de las variedades contienen capsaicina (metil vanilil nonenamida), un compuesto químico picante que produce una fuerte sensación de ardor en la boca y que puede utilizarse como estimulante circulatorio y aliviador del dolor en medicina. Las plantas son originarias de América Central y Sudamérica pero, dado que toleran casi cualquier clima, los frutos se producen en todo el mundo. Los pimientos comerciales son principalmente de las especies *Capsicum annuum* (pimentón, pimienta roja, pimiento Jalapeño, pimiento Anaheim), *Capsicum frutescens* (pimienta para Tabasco) y *Capsicum chinense* (pimiento Habanero).

25 *Capsicum annuum*, también conocido como pimentón o pimiento, es una especie herbácea anual con frutos que varían en longitud, color y picante, dependiendo de la variedad cultivada. La especie se cultiva en todo el mundo, por ejemplo en Europa Occidental y los Estados Unidos de América (EE. UU.). *Capsicum frutescens* y *C. chinense* tienen un fruto picante extremadamente pequeño y se utilizan en tabascos y otros productos de chili picante. Dado que un clima bastante cálido es necesario para un fuerte aroma, las especies se cultivan principalmente en regiones tropicales y en regiones más cálidas de los EE. UU.

30 Los cultivos vegetales de *Capsicum* spp., resultan dañados por muchos *Tobamovirus* durante el cultivo. El género *Tobamovirus* incluye la especie tipo *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), y las relacionadas serológicamente *Virus del mosaico del tomate* (ToMV), *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV) y varios virus vegetales más. Las infecciones víricas pueden reducir el vigor de la planta pero habitualmente no la matan. El TMV, por ejemplo, que afecta a una amplia gama de plantas, incluyendo pimiento, tomate y berenjena, causa necrosis grave en los frutos de pimiento, dejando a la mayor parte de los frutos no aptos para su comercialización. El TMV es una enfermedad altamente persistente, dado que puede permanecer viable en el suelo durante muchos años.

40 El PMMoV infecta sistemáticamente a todo el *Capsicum* spp., incluyendo variedades cultivadas que son resistentes a TMV y ToMV. Los síntomas de la enfermedad en plantas de pimentón incluyen atrofia de plantas jóvenes, arrugamiento y moteado amarillo de las hojas. Los frutos presentan malformaciones (abultado y moteado) y presentan un tamaño ligeramente reducido.

45 En 1980, se aisló una cepa viral de un virus similar a TMV (tm-3) que podía infectar a las líneas de *Capsicum* resistentes a PMMoV conocidas en ese momento (Boukema y otros, 1980). La cepa aislada se denominó cepa P14 de TMV. Después del descubrimiento de la cepa P14, en 1982 se descubrió una línea de la especie vegetal *C. chacoense* (línea PI 260429) que mostraba resistencia a este nuevo virus (Boukema, 1982). Más adelante se determinó que la resistencia en esta planta era otorgada por el alelo L4 del locus L (Boukema, 1984, *Capsicum Newsletter* 3:47-48) y que la cepa P14 era capaz de superar la resistencia anterior otorgada por el alelo L3, mientras que no podía romper la resistencia otorgada por el alelo L4. Esta cepa que rompe la resistencia otorgada por L3, clasificada originalmente como TMV, se reclasificó más adelante como un patotipo de PMMoV específico y al patotipo se le asignó el patotipo 1.2.3.

55 Matsunaga H y col. 2003 (*Journal Jap. Soc. Horticult. Sci, Engeli Gakkai, Tokio, Jp, vol. 72 (3), págs. 218-220*) y Boukema, 1984 (*Capsicum Newsletter, vol. 3, págs. 54-55*) divulgan plantas de *Capsicum* que presentan resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV debido a la presencia del gen de resistencia L4 derivado de *C. chacoense*.

60 Entre los obtentores, la línea de *C. chacoense* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV, así como líneas de pimiento comerciales derivadas de la misma, se denominan habitualmente como líneas resistentes a Tm3. Muchas compañías de reproducción han introgresado desde entonces material genético de esta línea de *C. chacoense* que comprende el alelo L4 a sus líneas reproductoras para obtener plantas de pimiento resistentes con características favorables desde el punto de vista comercial.

65 Actualmente es conocido que el alelo L4 otorga resistencia a una serie de virus, incluyendo ToMV, TMV, y a los patotipos de PMMoV 1, 1.2 y 1.2.3. La resistencia otorgada por el alelo L4 se denomina en lo sucesivo en el presente documento "resistencia a PMMoV", aunque en términos estrictos otorga una resistencia más amplia, tal como se ha descrito anteriormente.

La nomenclatura de *Tobamovirus* ha sido objeto de varias revisiones en el periodo entre 1980 y 2004. En el presente documento, se utiliza la nomenclatura del documento "Guidelines for the conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability" [Directrices para la realización de ensayos para diferenciación, uniformidad y estabilidad] (TG/76/7) para pimiento (*C. annuum* L.) expedido por la Union for the Protection of New Varieties of Plants [unión para la protección de nuevas variedades de plantas] (UPOV) el 04.11.1994. En estas directrices, se considera que la resistencia genética a patotipos de *Tobamovirus* del pimiento está controlada por 5 alelos (L, L¹, L², L³ y L⁴) ubicados en el mismo locus (locus L). En el presente documento se hace referencia explícitamente a la Tabla en las páginas 21-22 de la directriz de la UPOV mencionada anteriormente TG/76/7, en la que se muestra la relación entre resistencia contra los diversos patotipos de los virus y las composiciones alélicas que otorgan resistencia en pimiento. Un genotipo L³L³ homocigótico de *C. annuum* otorga resistencia al *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), *Virus del mosaico del tomate* (ToMV), *Virus del mosaico del pimentón* (BePMV), *Virus del mosaico verde atenuado del tabaco* (TMGMV), *Virus de las manchas amarillas de la dulcamara* (DYFV), y el patotipo 1.2 del *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV), mientras que el genotipo L⁴L⁴ homocigótico proporciona una resistencia adicional al patotipo 1.2.3 del *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV).

La nomenclatura de la UPOV difiere en parte de la nomenclatura empleada habitualmente en la bibliografía científica sobre virología. Generalmente en la bibliografía científica, la nomenclatura se limita al nombre específico y la denominación del aislado. La denominación del patotipo solamente se describe de forma muy ocasional. Por ejemplo, el patotipo 1.2.3 de PMMoV no está incorporado en The Universal Virus Database [Base de Datos Universal de Virus] del International Committee on Taxonomy of Viruses [Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus] (ICTV). Debe observarse además que, con respecto a la nomenclatura y los desarrollos de ésta con el tiempo, un *Tobamovirus* dado puede haber adquirido dos o más nombres comunes y puede haber sido, además, reclasificado tal como se explica con más detalle más adelante. Debe entenderse que, independientemente de cualquier nueva designación de un aislado viral, la presente invención se refiere a la resistencia de plantas a cualquier cepa viral que es otorgada por el alelo L4.

Se ha indicado anteriormente, la resistencia de *Capsicum* spp., a *Tobamovirus* es otorgada por alelos específicos de patotipo (L1, L2, L3, L4) del gen L, y la resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV es otorgada por el alelo L4. La región donde está ubicado el locus L está situada en el telómero del cromosoma 11 sur (Lefebvre y otros, 2002). Los alelos de resistencia actúan mediante activación de la respuesta hipersensible (RH).

Una característica notable y no deseada de la resistencia otorgada por el alelo L4 cuando es introgresado desde *C. chacoense* a otra especie de *Capsicum*, es que la resistencia en las nuevas líneas vegetales es heredada de forma no Mendeliana. La ley de Mendel de la segregación afirma que los pares de alelos segregan durante la formación de gametos, y se unen aleatoriamente en la fertilización. Para cada carácter, un organismo diploide hereda dos alelos, uno de cada progenitor. Si los dos alelos difieren, entonces uno, el alelo dominante, se expresa completamente en el fenotipo del organismo; el otro, el alelo recesivo no tiene ningún efecto perceptible sobre el fenotipo. Según la herencia Mendeliana normal, el cruce de una planta con un alelo homocigótico dominante y una planta con un alelo homocigótico recesivo dará como resultado una F₁, o primera población filial, que es uniforme, tanto genética (toda la población es heterocigótica) como fenotípicamente (toda la población expresa el rasgo dominante). Se dice que dicha población F₁ es no segregante para ese rasgo dominante (por supuesto en la población F₂ se producirá segregación). Por lo tanto, una población F₁ no segrega para un rasgo dominante cuando, como mínimo, uno de los progenitores es homocigótico para ese rasgo. Del mismo modo, la presencia de una F₁ no segregante confirma la homocigosis de un rasgo dominante en una de las líneas parentales. Sin embargo, éste no es el caso con líneas vegetales comerciales en las que se introgressa el alelo L4.

Para los obtentores de plantas, es importante que las líneas de cultivo sean homocigóticas (línea genéticamente pura), dado que el resultado de la reproducción debe ser preferentemente predecible. Cuando, por ejemplo, se produce un híbrido comercial a partir de dos líneas (homocigóticas) consanguíneas, las plantas F₁ heterocigóticas resultantes son más adecuadas que sus progenitores consanguíneos como resultado del vigor híbrido o heterosis. Los obtentores de plantas aprovechan deliberadamente dichos cruzamientos heteróticos para generar una progenie más robusta y las líneas consanguíneas homocigóticas sirven como líneas productoras con alto valor económico. En la práctica de cultivo por lo tanto, es habitual evaluar si una línea vegetal es homocigótica para un rasgo de resistencia dominante otorgado por un único gen (es decir, un rasgo dominante monogénico) autofertilizando esa línea vegetal y cribando su descendencia para no segregación. Como alternativa una línea vegetal dominante homocigótica esperada puede cruzarse con una línea recesiva homocigótica con lo cual una F₁ segregante revela que el progenitor "dominante" ensayado es no homocigótico.

Se cree que el alelo de resistencia L4 es un alelo de resistencia dominante monogénico normal (Boukema, 1983; Van Duijn, 1998). Sin embargo, en el caso de la resistencia a PMMoV otorgada por el alelo de resistencia L4, los obtentores generalmente observan problemas con la predictabilidad de los cruzamientos de líneas homocigóticas y la estabilidad de esas líneas. Mientras que la autofertilización de una planta resistente homocigótica (L4L4) esperada, da como resultado invariablemente una descendencia con un fenotipo resistente uniforme (confirmando de este modo la homocigosis de la planta progenitora), el cruzamiento, por otro lado, de dicha planta progenitora resistente homocigótica con una planta progenitora susceptible (es decir, una que carece del alelo L4) da como resultado a

menudo una F₁ que comprende plantas resistentes y susceptibles, es decir en una F₁ segregante. La susceptibilidad de las plantas puede detectarse, por ejemplo, mediante la presencia de un mosaico sistémico después de la inoculación con el patotipo 1.2.3 de PMMoV. Este fenómeno, en el que la resistencia se pierde sorprendentemente en algunas de las plantas de la descendencia F₁, es muy inconveniente para los obtentores por razones indicadas anteriormente. Los obtentores a menudo se refieren a dichas plantas progenitoras homocigóticas impredecibles como plantas "segregantes", aunque en términos estrictos, su descendencia F₁ es segregante.

En el desarrollo de líneas consanguíneas resistentes a PMMoV mejoradas, y utilizando cruzamientos de selección y ensayo de plantas convencionales, los obtentores han demostrado recientemente ser capaces de obtener plantas homocigóticas que producen una F₁ normal no segregante, (es decir, una que sigue la ley de Mendel), habiendo fijado de este modo la resistencia otorgada por el alelo L4 en esa línea. Actualmente no está claro cómo se consiguió esto. Un problema fundamental de estas plantas "no segregantes" es, sin embargo, que muestran fertilidad reducida y un crecimiento enano. Una importante consecuencia de la fertilidad reducida es que dichas plantas producen cantidades limitadas de semillas y/o una cantidad limitada de polen. Por lo tanto, aunque dichas plantas son resistentes y "no segregantes", muestran un fenotipo caracterizado por una baja fertilidad y un crecimiento enano que es no deseado para la producción de semillas comerciales. El crecimiento enano puede estar indicado, por ejemplo, por la maduración tardía de la semilla (es decir crecimiento lento) o por una (velocidad de) desarrollo de la planta reducido. Este fenotipo se denominará más adelante en esta solicitud como un "fenotipo SNFD", de *Segregating Non-Fertile Dwarf* [Enano no Fértil Segregante]. Actualmente no existe ninguna explicación para la asociación entre estos rasgos negativos, que incluyen problemas de crecimiento, fertilidad y esterilidad, y la introgresión del alelo L4 de *C. chacoense* a otras líneas de *Capsicum* (véase, por ejemplo Van Duin, 1998).

Se ha descubierto que la introgresión de cualquiera de los alelos L1, L2 y L3 del gen L en *Capsicum* spp., siempre produce poblaciones con herencia Mendeliana sin mostrar el fenotipo SNFD en plantas resistentes homocigóticas. La introgresión de L4 de *C. chacoense*, ahora por primera vez, da origen a los problemas anteriores.

Actualmente existe una necesidad de plantas de pimiento que sean resistentes al patotipo 1.2.3 de PMMoV tal como es otorgada por el alelo L4, que sean "no segregantes", que muestren (velocidades de) desarrollo normales y que produzcan cantidades apropiadas de semillas. Es, por lo tanto, un objetivo de la presente invención seleccionar plantas del género *Capsicum*, que combinan resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV según lo otorgado por el alelo L4 con rasgos buenos desde el punto de vista agronómico o comercial, tales como buen crecimiento y producción de semillas normales, por lo tanto sin las características no deseadas del fenotipo SNFD.

Resumen de la invención

Este objetivo se consigue mediante la presente invención. Según la presente invención, se ha descubierto que es posible romper el vínculo entre la resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV y el fenotipo SNFD, observado en plantas homocigóticas tal como se ha descrito anteriormente, reduciendo el tamaño de la introgresión genómica que comprende el alelo L4. En particular, esto se consigue mediante la eliminación de información genética del alelo de resistencia L4 que está en las proximidades directas de la parte que otorga resistencia a PMMoV del alelo L4. El resultado de esto es que la resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV puede transferirse de una planta a otra sin la transferencia de la parte que otorga el fenotipo SNFD y se ha hecho posible, de este modo, producir plantas resistentes a PMMoV y valiosas desde el punto de vista agronómico que no muestran el fenotipo SNFD.

La invención proporciona marcadores según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3. La invención también proporciona un par de cebadores según la reivindicación 4. La invención también proporciona un procedimiento de selección según la reivindicación 5.

Sin desear quedar vinculado a la teoría, se cree que los efectos secundarios negativos característicos del fenotipo SNFD son causados por el fragmento del cromosoma de *C. chacoense* en el que está situado el alelo L4 y que, cuando el fragmento del cromosoma de *C. chacoense* se inserta, por ejemplo, en un genoma de *C. annuum*, el fenotipo SNFD es causado por genes recesivos en las proximidades de la parte que otorga resistencia del alelo L4 que están ligados genéticamente al propio alelo L4 y alteran la organización cromosómica del genoma de la planta receptora. Por lo tanto, el fenotipo SNFD se expresa solamente en plantas que son homocigóticas para la introgresión cromosómica de *C. chacoense* del alelo L4 completo.

Ahora que se ha obtenido este importante conocimiento sobre la posibilidad de romper el vínculo entre los fenotipos deseados y no deseados otorgados por el alelo L4, se ha vuelto posible seleccionar plantas en las que la información genética para el fenotipo SNFD se elimina de las proximidades de la parte que otorga resistencia del alelo L4 o se cambia en tal medida que, en plantas homocigóticas, el fenotipo SNFD ya no se expresa en combinación con ésta.

Se describe en este documento una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 del *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV) debido a la presencia del alelo de resistencia L4 en el genoma de dicha planta, en el que dicho alelo L4 está truncado. El truncamiento proporciona un alelo de longitud reducida y da como resultado plantas no segregantes que son fértiles y muestran un crecimiento normal, es decir la ausencia del fenotipo SNFD.

La ausencia de la información genética responsable del fenotipo SNFD puede realizarse mediante la eliminación o el cambio de la información genética en las proximidades del alelo L4 que da como resultado el fenotipo SNFD y es producida, preferentemente, por un suceso o sucesos de recombinación en las proximidades del alelo L4. Cuando la información de SNFD está presente solamente en un lado del alelo, un único suceso de recombinación es suficiente para eliminar esta información. Cuando la información genética para el fenotipo SNFD está en ambos lados del alelo de resistencia, ambas partes de esta información genética se cambian o eliminan preferentemente. Según una realización preferente descrita en el presente documento, se seleccionan plantas en las que, como mínimo, ha tenido lugar un suceso de recombinación, preferentemente un suceso de recombinación en el lado norte (lado centromérico) del alelo L4 en el lado sur del cromosoma 11, aunque truncamientos en el lado telomérico también son posibles. En el caso de una recombinación doble, no es necesario que los sucesos de recombinación hayan tenido lugar en una generación, sino que sucesos de recombinación de generaciones sucesivas pueden dar como resultado conjuntamente la eventual eliminación o cambio de la información genética en uno o ambos lados del alelo de resistencia. El, como mínimo, un suceso de recombinación debe realizarse de modo que la información genética responsable de otorgar la resistencia no se elimine, manteniendo de este modo la presencia de la parte que otorga resistencia del alelo de resistencia L4.

En una realización preferente de una planta como se describe en el presente documento dicho alelo de resistencia L4 se deriva del genoma de *C. chacoense*.

Para evaluar si la información genética apropiada se ha eliminado o cambiado, el experto en la materia puede utilizar apropiadamente marcadores genéticos. La presente invención describe a continuación varios marcadores genéticos que pueden utilizarse en, por ejemplo, selección asistida por marcador de plantas recombinantes. Dicha utilización es bien conocida en la técnica y se describirá con más detalle más adelante.

En una realización preferente, se describe en el presente documento una planta en la que la información genética responsable del fenotipo SNFD está ausente tal como se indica mediante la ausencia de, como mínimo, un marcador ligado al alelo de resistencia L4, en la que dicho marcador se selecciona entre el grupo que comprende marcadores del Grupo 2 (E35/M49-F-90, E39/M58-F-65, E39/M51-F-380, E58/M62-F-168, E66/M54-F-600 y Tm3-DRS), marcadores del Grupo 3 (E60/M54-F-447) y marcadores del Grupo 1/3 (E63/M61-F-501, E66/M43-F-387, E66/M49-F-387, E66/M61-F-99, E67/M50-F-150, E67/M62-F-214, E70/M54-F-133, E71/M47-F-550, E74/M61-F-385), preferentemente marcadores del Grupo 3 y el Grupo 2, más preferentemente marcadores del Grupo 2 (E35/M49-F-90, E39/M58-F-65, E39/M51-F-380, E58/M62-F-168, E66/M54-F-600 y Tm3-DRS).

En otra realización preferente, se describe en el presente documento una planta en la que la presencia del alelo de resistencia L4 está indicada por la presencia de, como mínimo, un marcador vinculado al alelo de resistencia L4 seleccionado entre los marcadores del Grupo 1 (E58/M50-F-580, E39/M58-F-95, E58/M60-F-255 y E54/M55-F-101), y el Grupo 1/3 (E63/M61-F-501, E66/M43-F-387, E66/M49-F-387, E66/M61-F-99, E67/M50-F-150, E67/M62-F-214, E70/M54-F-133, E71/M47-F-550, E74/M61-F-385), preferentemente seleccionado entre marcadores del Grupo 1, más preferentemente seleccionado entre los marcadores E58/M50-F-580 y E54/M55-F-101.

Los marcadores mencionados anteriormente se basan en cebadores AFLP que están constituidos por "cebadores centrales" (5'-GACTGCGTACCAATTC-3' y 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'), que corresponden a los sitios de restricción de las enzimas de restricción EcoRI (codificada como E) y MseI (codificada como M), respectivamente, más tres nucleótidos selectivos adicionales, que se indican mediante un código de cebador. Los códigos de cebador pueden encontrarse en la página Web <http://www.keygene.com/publications/index.htm> y específicamente en el documento titulado "KF Nomenclature Primer Enzyme Combinations.pdf" que se divulga en esa página. El tamaño del fragmento amplificado (en pares de bases) se indica después de la combinación de cebador y enzima. Por ejemplo el marcador E58/M60-255 indica un fragmento amplificado de 255 pares de bases, conseguido después de cortar ADN con la combinación de cebador y enzima [EcoRI+código de cebador 58 / MseI+código de cebador 60].

Los códigos de cebador son los siguientes: 35:ACA; 39:AGA; 43:ATA; 47:CAA; 49:CAG; 50:CAT; 51:CCA; 54:CCT; 55:CGA; 58:CGT; 60:CTC; 61:CTG; 62:CTT; 63:GAA; 66:GAT; 67:GCA; 70:GCT; 71:GGA; 74:GGT. Un ejemplo de código de combinación cebador - enzima E63/M61-F-501 es: EcoRI + GAA (= E63) / MseI + CTG (= M61).

El marcador Tm3-DRS, derivado del marcador TG036 (Lefebvre y otros, 2002) es un marcador definido por el par de cebadores de PCR P118 (secuencia 5'-AATCCTTCAACTGCCATTC-3') y el cebador P119 (secuencia 5'-ATTGGGACATGAGGTGTGTA-3') y puede detectarse realizando una PCR con los cebadores P118 y el cebador P119, después de lo cual el producto de PCR es digerido con TruI (sitio de restricción TTA). La presencia de un fragmento amplificado de aproximadamente 350 pares de bases indica la presencia del alelo L4.

La provisión de una planta en la que la información genética responsable del fenotipo SNFD está ausente o eliminada también puede describirse en términos de proporcionar una planta con un alelo L4 truncado tal como se describe con más detalle más adelante. Los aspectos relacionados con dicho truncamiento se aplican de forma similar a la eliminación o el cambio de la información genética tal como se ha descrito anteriormente.

En otra realización preferente de una planta descrita en el presente documento, la planta es una planta de la especie *C. annum*.

5 En otra realización preferente más de la planta descrita en el presente documento, la planta es homocigótica para el alelo de resistencia L4, y la planta homocigótica es, preferentemente, una planta consanguínea.

10 En otro aspecto, se describe en el presente documento una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 del *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV) debido a la presencia del alelo de resistencia L4 en el genoma de dicha planta, en la que dicho alelo L4 está truncado y en la que dicho truncamiento comprende la eliminación de secuencias de nucleótidos en una distancia genética de aproximadamente 0,001 a 10 cM desde el lado telomérico y/o centromérico, preferentemente de 0,001 a 10 cM desde el lado centromérico del alelo. Las realizaciones preferentes tal como se ha descrito anteriormente también se aplican para la planta según este aspecto descrito en el presente documento.

15 La frecuencia de recombinación observada entre marcadores del Grupo 1, que comprenden el gen o genes de resistencia TM-3 centrales, y los marcadores del Grupo 3 era equivalente a una distancia de aproximadamente 2 cM. La frecuencia de recombinación observada entre marcadores del Grupo 1 y marcadores del Grupo 2 era también equivalente a una distancia de aproximadamente 2 cM. No podía determinarse ninguna distancia entre cualquiera de los marcadores en los Grupos de marcadores identificados en el presente documento debido a la ausencia de recombinación. Por lo tanto, un truncamiento tal como se describe en el presente documento preferentemente representa una delección genética durante una distancia de menos de 2 cM desde cualquiera de los marcadores ubicados centroméricos (Grupo 2) o telomérico (Grupo 3) desde la ubicación de cualquiera de los marcadores del Grupo 1.

20 En otro aspecto, se describe en el presente documento una planta de pimiento híbrida que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV, que puede obtenerse cruzando una planta homocigótica, preferentemente consanguínea, descrita en el presente documento con otra planta de pimiento homocigótica, preferentemente consanguínea que muestra características deseables desde el punto de vista comercial.

30 En aún otro aspecto, se describe en el presente documento una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende un alelo de resistencia L4 truncado, en la que dicho alelo de resistencia L4 truncado comprende información genética capaz de ser expresada en una planta del género *Capsicum* otorgando de este modo resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV a dicha planta, y en el que la información genética que otorga el fenotipo SNFD está ausente de dicho alelo.

35 En una realización preferente de tal secuencia de ácido nucleico aislada que contiene la información genética que otorga resistencia comprende, como mínimo, un marcador seleccionado entre el grupo que comprende los marcadores E39/M58-F-95, E54/M55-F-101, E58/M60-F-255 y E58/M50-F-580, preferentemente seleccionado entre el grupo que comprende los marcadores E39/M58-F-95, E54/M55-F-101, E58/M60-F-255 y E58/M50-F-580, más preferentemente como mínimo un marcador seleccionado entre el grupo que comprende los marcadores E54/M55-F-101 y E58/M50-F-580, y la información genética que otorga resistencia comprende, además, la información genética que otorga el fenotipo SNFD y comprende la ausencia de dicho alelo de resistencia L4 de, como mínimo, un marcador seleccionado entre el grupo que comprende marcadores del Grupo 2 y marcadores del Grupo 3, preferentemente marcadores del Grupo 2. En una realización la más preferente, el alelo de resistencia L4 comprendido en la secuencia de ácido nucleico aislada descrita en el presente documento se deriva del genoma de *C. chacoense*.

45 En otro aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento de producción de una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV, que comprende las etapas de a) proporcionar una planta receptora del género *Capsicum* que es susceptible al patotipo 1.2.3 de PMMoV, o una parte de la misma, y b) introducir en el genoma de dicha planta receptora o una parte de la misma o una planta de la progenie de la misma una región genómica que comprende un alelo de resistencia L4 truncado, en la que dicho alelo comprende información genética capaz de expresarse en dicha planta o parte de la planta o planta de la progenie otorgando de este modo resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV a dicha planta o parte de la planta o planta de la progenie, y en la que la información genética que otorga el fenotipo SNFD está ausente de dicho alelo, como mínimo en una medida tal que el fenotipo SNFD no se expresa. La etapa b) puede ser precedida por la provisión de dicha región genómica que comprende un alelo de resistencia L4 truncado, por ejemplo en forma de una planta donadora recombinante que tiene una forma truncada del alelo de resistencia L4 tal como se describe en el presente documento, o en forma de un vector que comprende dicha región genómica como un inserto.

50 Una región genómica que comprende un alelo de resistencia L4 truncado utilizada en un procedimiento como se describe en el presente documento comprende un alelo de resistencia L4 cuyo tamaño es reducido en comparación con el alelo L4, lo que da como resultado plantas que tienen el fenotipo SNFD. El tamaño del alelo de resistencia L4 se reduce de modo que la reducción de tamaño no afecta a la información genética responsable de otorgar la resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV.

65 Un procedimiento muy adecuado para realizar la introducción de la región genómica que comprende un alelo de resistencia L4 truncado se realiza mediante introgresión del genoma en una planta de la progenie derivada de un

5 cruzamiento entre la planta receptora y una planta donadora resistente al patotipo 1.2.3 de PMMoV del género *Capsicum* que comprende un alelo de resistencia L4. El proceso de introgresión es bien conocido por el experto en la materia y generalmente implica la introducción de uno o más genes de una especie en el acervo genético de otra a través de retrocruzamiento repetido de un híbrido interespecífico con uno de sus progenitores.

10 El experto en la materia entenderá fácilmente que la introgresión no es, sin embargo, la única manera en la que el alelo de resistencia L4 o una región genómica que comprende el alelo de resistencia L4 puede introducirse en el genoma de una planta. Otros procedimientos pueden implicar, por ejemplo, la utilización de técnicas transgénicas, tales como fusión de células haploides, transformación de plantas y similares. La introducción de dicha región genómica también puede realizarse, por lo tanto, mediante técnicas de cultivo in vitro, mediante fusión de protoplastos, mediante transformación o mediante una técnica de haploide doble. A menudo, dichas técnicas no se realizan con plantas intactas sino con partes de plantas, en general el material reproductor de dicha planta, tal como cultivos tisulares de células individuales o protoplastos. Por lo tanto, para obtener una planta descrita en el presente documento, dichos procedimientos pueden incluir opcionalmente una etapa adicional de crecimiento de dicha parte de planta en una planta de pimiento. Generalmente esto implicará regenerar plantas o material reproductor de dichas plantas o ambos de la parte de planta o tejido transformado con ADN heterólogo y, opcionalmente, replicar biológicamente dichas plantas o material reproductor o ambos.

20 Un procedimiento como se describe en el presente documento en el que un alelo de resistencia L4 truncado se introduce en una planta receptora del género *Capsicum* mediante el proceso de introgresión da como resultado, preferentemente, una planta de la progenie que tiene introgresado en su genoma una región genómica que comprende un alelo de resistencia L4 truncado. Dado que el proceso de obtener plantas de la progenie con alelos de resistencia L4 truncados implica recombinación, es preferente que una población segregante se produzca antes de realizar cualesquiera selecciones en base al fenotipo o el genotipo de plantas de la progenie. Por lo tanto, la planta de la progenie a producir y que tiene en su genoma un gen de resistencia L4 truncado es, preferentemente, una planta de una población segregante, por ejemplo producida mediante auto-polinización de una planta F₁ obtenida del cruzamiento mencionado anteriormente, o cruzando una planta F₁ obtenida a partir de dicho cruzamiento con otra planta de pimiento.

30 En procedimientos descritos en el presente documento, la región genómica se introduce, preferentemente, desde el genoma de *C. chacoense* y la planta receptora utilizada en dichos procedimientos es, preferentemente, una planta de *C. annuum*.

35 Aunque los elementos básicos de un procedimiento de producción de una planta descrito en el presente documento se han descrito ahora, un procedimiento descrito en el presente documento puede comprender etapas adicionales. En una realización preferente, un procedimiento descrito en el presente documento comprende, además, las etapas de c) seleccionar una planta resistente al patotipo 1.2.3 de PMMoV o una planta de la progenie de la misma resistente al patotipo 1.2.3 de PMMoV, y d) seleccionar una planta resistente o una planta de la progenie resistente que no exprese el fenotipo SNFD.

40 La etapa de seleccionar una planta o planta de la progenie resistente al patotipo 1.2.3 de PMMoV puede realizarse mediante procedimientos basados en determinación fenotípica, tales como utilizando un bioanálisis de resistencia, por ejemplo inoculando una hoja de la planta con una suspensión de patotipo 1.2.3 de PMMoV y evaluando la aparición de infección. En realizaciones preferentes sin embargo, la etapa de seleccionar una planta resistente al patotipo 1.2.3 de PMMoV comprende el proceso de cribar el genoma de dicha planta o planta de la progenie para la presencia de, como mínimo, un marcador del alelo de resistencia L4 seleccionado entre el grupo que comprende marcadores del Grupo 1 o del Grupo 1/3 indicativos de la presencia de la parte que otorga resistencia del alelo L4 en dicha planta. Los marcadores del Grupo 1 adecuados incluyen los marcadores E39/M58-F-95, E54/M55-F-101, E58/M60-F-255 y E58/M50-F-580, preferentemente se determina la presencia de, como mínimo, un marcador seleccionado entre el grupo que comprende marcadores E54/M55-F-101 y E58/M50-F-580. Los marcadores del Grupo 1/3 adecuados para evaluar la presencia del rasgo de resistencia incluyen aquellos marcadores cuya presencia en plantas resistentes ha establecido el experto en la materia. Los marcadores del Grupo 1/3 comprenden tanto marcadores que indican el alelo de resistencia L4 como marcadores que indican las partes que otorgan el fenotipo SNFD en ese alelo. Por lo tanto, algunos marcadores del Grupo 1/3 indican un truncamiento adecuado que elimina las partes que otorgan el fenotipo SNFD en el alelo de resistencia L4 y que son análogas de los marcadores del Grupo 3, mientras que otros marcadores del Grupo 1/3 indican la presencia de los genes de resistencia centrales o secuencias reguladoras de los mismos que son análogos de los marcadores del Grupo 1.

60 La etapa de seleccionar entre dichas plantas resistentes al patotipo 1.2.3 de PMMoV, una planta o planta de la progenie que no exprese el fenotipo SNFD (etapa d descrita anteriormente) constituye el núcleo del proceso de cultivo asistido por marcadores divulgado por la presente invención. La selección de una planta o planta de la progenie resistente que no expresa el fenotipo SNFD preferentemente comprende el cribado del alelo de resistencia L4 truncado en el genoma de la planta o planta de la progenie resistente para, como mínimo, un marcador del alelo de resistencia L4 seleccionado entre el grupo que comprende marcadores del Grupo 2 y marcadores del Grupo 3 (opcionalmente también seleccionado entre marcadores del Grupo 1/3), preferentemente marcadores del Grupo 2, y seleccionar una planta o

planta de la progenie en la que, como mínimo, uno de dichos marcadores está ausente indicando de este modo el truncamiento.

5 En otro aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento para producir una planta consanguínea del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV, que comprende realizar un procedimiento de producción de una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV tal como se ha descrito anteriormente y realizar además las etapas de: e) autofertilizar las plantas seleccionadas; f) plantar la semilla obtenida de dicha autofertilización y hacer crecer dicha semilla a plantas; g) identificar plantas de la etapa g) que muestran resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV y poseen características deseables desde el punto de vista comercial, y h) repetir las etapas e)-g) hasta que se produzca una planta de pimiento consanguínea que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV y posee características deseables desde el punto de vista comercial. Características deseables desde el punto de vista comercial en el contexto de la presente invención pueden referirse a cualquier característica tal como una característica del fruto como por ejemplo un aspecto mejorado, una mayor producción de semillas, fertilidad mejorada, una mayor producción de frutos, un fruto más grande o más pequeño, o un color o sabor del fruto mejorado; o por ejemplo a características tales como una resistencia del tallo mejorada, un sistema radicular mejorado, resistencia al estrés mejorada, resistencia a la enfermedad mejorada, etc. En la práctica, una característica deseable desde el punto de vista comercial puede ser cualquier característica que hará a la planta más valiosa desde el punto de vista comercial respecto a una planta de tipo silvestre.

20 En otro aspecto, se describe en el presente documento una planta o planta consanguínea del género *Capsicum*, que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV que puede obtenerse mediante uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente.

25 En otros aspectos, se describe en el presente documento la progenie de una planta como se describe en el presente documento, a partes tales como hojas, tallos, raíces, puntas de la raíz, rizomas, brotes, frutos y similares o partes tales como células, protoplastos, callos, masas celulares, embriones (somáticos), anteras, peciolos, polen, óvulos, flores, células en cultivo, semillas y similares de una planta descrita en el presente documento. Dichas partes pueden ser adecuadas para propagación, preferentemente mediante cultivo tisular (de órganos), o pueden ser adecuadas para el consumo, tales como un fruto.

30 En otro aspecto, se describe en el presente documento una semilla de pimiento producida cultivando una planta de pimiento descrita en el presente documento.

35 En otro aspecto, se describe en el presente documento una planta de pimiento híbrida, o parte de la misma, que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV, que puede obtenerse cruzando una planta de pimiento consanguínea como se describe en el presente documento que puede obtenerse mediante un procedimiento descrito en el presente documento con, preferentemente, una planta de pimiento consanguínea que muestra características deseables desde el punto de vista comercial.

40 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el micromapa del locus L4 que indica diferentes grupos (Grupo 1, 2, 3, 1/3) de marcadores, ligados a este locus, los marcadores presentes en cada uno de estos grupos se enumeran en la Tabla 1 tal como se muestra en el Ejemplo 1.

45 La figura 2 muestra el mismo micromapa en el que se indican los marcadores individuales.

La figura 3 da a conocer información detallada sobre los marcadores tal como se utilizan en el presente documento y en particular la información de la secuencia de nucleótidos y la longitud del marcador. La longitud del marcador es la longitud aproximada en pares de bases de un fragmento de ADN amplificado llevando a cabo una reacción de PCR con los cebadores hincados utilizando ADN genómico aislado de la entrada PI 260429 de *C. chacoense* como ADN plantilla.

50 Descripción detallada de la invención

55 Definiciones

Los encabezamientos que se dan a conocer en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la presente invención que pueden tenerse haciendo referencia a la memoria descriptiva como un conjunto. Por consiguiente, las expresiones definidas inmediatamente a continuación se definen más completamente haciendo referencia a la memoria descriptiva como un conjunto.

60 La expresión "alelo resistente L4" o "alelo L4" se utiliza en el presente documento para referirse al alelo de resistencia específica al patotipo del gen L de *Capsicum* spp., que otorga a estas plantas resistencia al Virus del mosaico del tomate (ToMV) y el *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV), patotipos 1, 1.2, y 1.2.3., tal como se ha descrito en primer lugar por Boukema (1984) y cuyo gen es parte del locus L. La región donde el locus L está ubicado

está situada en el telómero del cromosoma 11 sur. El alelo L4 en forma no truncada se asocia con el marcador Tm3-DRS. El alelo L4 representa, por lo tanto, una secuencia de nucleótidos, por ejemplo derivable de la entrada PI 260429 de *C. chacoense*, bordeada por uno o más marcadores del Grupo 2 tal como se definen en el presente documento (E35/M49-F-90, E39/M58-F-65, E39/M51-F-380, E58/M62-F-168, E66/M54-F-600 y Tm3-DRS) y uno o más marcadores del Grupo 3 o del Grupo 1/3 (E60/M54-F-447, E63/M61-F-501, E66/M43-F-387, E66/M49-F-387, E66/M61-F-99, E67/M50-F-150, E67/M62-F-214, E70/M54-F-133, E71/M47-F-550, E74/M61-F-385) y secuencia de nucleótidos que otorga resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “patotipo 1.2.3 del *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV)” indica una cepa de virus del moteado atenuado que infecta a *Capsicum* que es capaz de superar la resistencia otorgada por el alelo L3. En la bibliografía, dichas cepas se indican generalmente con la expresión cepa de PMMoV que rompe la resistencia. Debe entenderse que los acrónimos aprobados por el ICTV PMMoV y PMMV pueden utilizarse ambos para indicar *Virus del moteado atenuado del pimiento*. Los sinónimos de PMMoV que pueden encontrarse en la bibliografía son: cepa Samsun latente del virus del mosaico del tabaco (SL-TMV), virus del mosaico del pimiento y virus del mosaico de Capsicum. Debido a rápidos desarrollos en la clasificación viral, algunas cepas, especialmente las cepas holandesas originales (Tobias y otros, 1982), que se clasificaron inicialmente como *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV; código decimal del ICTV 71.0.1.0.007), se clasifican ahora como *Virus del moteado atenuado del pimentón* (PaMMV; código decimal del ICTV 71.0.1.0.006). La expresión “patotipo 1.2.3 del *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV)” tal como se utiliza en el presente documento también incluye, por lo tanto, cepas de PaMMV capaces de superar la resistencia otorgada por el alelo L3 en plantas de pimiento. En general, los ejemplos de virus indicados mediante la expresión “Patotipo 1.2.3 del *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV)” tal como se utiliza en el presente documento, incluyen, aunque sin limitarse a, las siguientes cepas: aislado P14 de TMV (Boukema, 1982; Tobias y otros, 1982; Rast, 1988); las cepas italianas indicadas mediante PMMoV-1 (Wetter y otros, 1984; Rodríguez-Cerezo y otros, 1989; Velasco y otros, 2002; Berzal-Herranz y otros, 1995; García-Luque y otros, 1993); las cepas españolas indicadas mediante PMMoV-S (Tenllado y otros, 1997; Velasco y otros, 2002; Tenllado y otros, 1996; Berzal-Herranz y otros, 1995; García-Luque y otros, 1993; Alonso y otros, 1991; Avila-Rincon y otros, 1989; Rodríguez-Cerezo y otros, 1989.); las cepas japonesas indicadas mediante PMMoV-J y PMMoV-lj (Tsuda y otros, 1998; Hagiwara y otros, 2002; Kirita y otros, 1997); las cepas coreanas indicadas mediante PMMV-k (Lim y otros, 1997); y PaMMV (García-Luque y otros, 1993; Ruiz del Pino y otros, 2003; Gilardi y otros, 2004). Referencias acreditadas para la descripción del *Virus del moteado atenuado del pimiento* y el *Virus del moteado atenuado del pimentón* son, entre otras, Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. y Zurcher, E.J. (eds.) (1996 en adelante). “Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 16th January 1997” [Virus vegetales en línea: descripciones y listas de la base de datos VIDE. Versión: 16 de enero de 1997]. Y la Universal Virus Database [Base de datos de virus universal] del International Committee on Taxonomy of Viruses [Comité internacional sobre taxonomía de virus] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>).

Un “alelo truncado” se define en el presente documento como un alelo que tiene un tamaño más pequeño, en base a la distancia genética, que el alelo completo. La reducción del tamaño puede mostrarse por ejemplo mediante la ausencia de, como mínimo, un marcador ligado y/o la ausencia de un fenotipo distinguible, en el presente caso el fenotipo SNFD.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “alelo” o “alelos” significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen, refiriéndose la totalidad de dichos alelos, como mínimo, a un rasgo o característica. En una célula diploide, los dos alelos de un gen dado ocupan loci correspondientes en un par de cromosomas homólogos. Dado que la presente divulgación se refiere a QTL, es decir regiones genómicas que pueden comprender uno o más genes o secuencias reguladoras, en algunos casos es más preciso referirse a “haplotipo” (es decir un alelo de un segmento cromosómico) en lugar de “alelo”, sin embargo, en esos casos, debe entenderse que el término “alelo” comprende el término “haplotipo”. Los alelos se consideran idénticos cuando expresan un fenotipo similar. Las diferencias en la secuencia son posibles pero no son importantes siempre que no influyan en el fenotipo.

Una “región genómica” se define en el presente documento como una secuencia de nucleótidos, preferentemente una secuencia de ADN, que puede comprender secuencias con diversas funciones genómicas tales como genes y regiones de elementos reguladores. Una región genómica puede ser una construcción de nucleótidos y puede estar comprendida en un vector. Como alternativa, una región genómica puede ser transferida de una planta a otra mediante recombinación cromosómica después de cruzar dichas plantas. Una región genómica puede comprender, en principio, material genético originario de una o más especies.

Un “gen” se define en el presente documento como una unidad hereditaria que comprende una secuencia de ADN que ocupa una ubicación específica en un cromosoma y que contiene la instrucción genética para una característica o rasgo particular en un organismo.

Un “locus” se define en el presente documento como la posición en un mapa genético que ocupa un gen dado en un cromosoma de una especie dada.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “heterocigótico” significa un estado genético que existe cuando diferentes alelos residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “homocigótico” significa un estado genético que existe cuando alelos idénticos residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos. La homocigosis se define como la ausencia de segregación después de la autofertilización de una planta individual o, si se cruzó con una susceptible, ausencia de segregación en la F1.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “híbrido” significa descendencia de un cruzamiento entre dos individuos genéticamente diferentes (Rieger y otros, 1968).

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “consanguíneo” significa un individuo o línea sustancialmente homocigótico/a.

En esta solicitud se entiende que un “suceso de recombinación” significa un entrecruzamiento (meiótico).

15 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos “introgresión”, “introgresado” e “introgresar” se refieren al proceso mediante el cual genes de una especie, variedad o variedad cultivada se mueven al genoma de otra especie, variedad o variedad cultivada, cruzando esas especies. El cruzamiento puede ser natural o artificial. El proceso puede completarse opcionalmente mediante retrocruzamiento con el progenitor recurrente, en cuyo caso introgresión se refiere a infiltración de los genes de una especie en el acervo génico de otra a través de retrocruzamiento repetido de un híbrido interespecífico con uno de sus progenitores. Una introgresión también puede describirse como un material genético heterólogo integrado de forma estable en el genoma de una planta receptora.

20 “Ingeniería genética”, “transformación” y “modificación genética” se utilizan todas en el presente documento como sinónimos de la transferencia de cualquier tipo de información genética al ADN de la planta diana, habitual pero no exclusivamente el ADN o genoma cromosómico, de otro organismo. La ingeniería genética es un procedimiento de integrar de forma estable material genético heterólogo en el genoma de una planta receptora y puede incluir un proceso que comprende transformar células o tejido de una planta con un ADN recombinante que contiene un ADN heterólogo que incluye una secuencia de nucleótido extraña que codifica un gen o variante alélica del mismo, así como los elementos reguladores seleccionados entre aquellos que son capaces de causar la integración estable de ADN heterólogos en células o tejido vegetal y de permitir la expresión de secuencias de nucleótidos extrañas en células vegetales o tejido vegetal.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “marcador molecular” significa un marcador que puede obtenerse utilizando cualquier técnica tal como un marcador de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), marcador de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), marcador de polimorfismo de único nucleótido (SNP), marcador microsatélite, un marcador de repeticiones amplificadas caracterizadas por secuencia (SCAR) o un marcador de isozima o combinaciones de los marcadores descritos en el presente documento que define una ubicación genética y cromosómica específica y detecta un polimorfismo entre dos alelos. Los marcadores del Grupo 1, 2, 3 y 1/3 tal como se dan a conocer en el presente documento representan marcadores (en particular marcadores de AFLP) que comprenden una secuencia de nucleótidos bicatenaria o monocatenaria obtenida realizando una reacción de amplificación de ácido nucleico utilizando ADN genómico de *Capsicum* como plantilla y utilizando las secuencias cebadoras indicadas en la figura 3 como primer y segundo cebador de un par de cebadores de amplificación para proporcionar una secuencia de nucleótidos bicatenaria o monocatenaria que comprende una secuencia de nucleótidos específica de *Capsicum* y/o su complemento flanqueado en ambos lados por dichas secuencias de cebador y/o sus complementos. La expresión secuencia de nucleótidos específica de *Capsicum* se utiliza en el presente documento para indicar la secuencia tal como se obtiene cuando se utiliza ADN genómico DNA de la entrada PI 260429 de *C. chacoense* como ADN plantilla y secuencias que tienen una similitud de secuencia con ella, como mínimo, del 90%, preferible del 95%, más preferentemente del 97%, aún más preferentemente más del 98%.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción” o “RFLP” significa una variación entre individuos de tamaños de fragmentos de ADN cortados mediante enzimas de restricción específicas. Secuencias polimórficas que dan como resultado RFLP se utilizan como marcadores en mapas de ligamiento genético.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “población” significa una colección genéticamente homogénea o heterogénea de plantas que comparten una derivación genética común.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “variedad” o “variedad cultivada” significa un grupo de plantas similares que, mediante elementos estructurales y rendimiento, pueden identificarse de otras variedades dentro de la misma especie. El término “variedad” tal como se utiliza en el presente documento tiene un significado idéntico a la definición correspondiente en la International Convention for the Protection of New Varieties of Plants [Convención internacional para la protección de nuevas variedades de plantas] (tratado CTPOV), del 2 de diciembre de 1961, según lo Revisado en Génova el 10 de noviembre de 1972, el 23 de octubre de 1978, y el 19 de marzo de 1991. Por lo tanto, “variedad” significa un agrupamiento vegetal dentro de un único taxón botánico del rango más bajo conocido, agrupamiento que, independientemente de si se cumplen completamente las condiciones para la concesión de un

derecho de obtentor, puede i) definirse mediante la expresión de las características que resultan de un genotipo o combinación de genotipos dada, ii) distinguirse de cualquier otro agrupamiento vegetal mediante la expresión de, como mínimo, una de dichas características y iii) considerarse como una unidad con respecto a su idoneidad para propagarse sin cambios.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “pimiento” o “*Capsicum*” significa cualquier especie, variedad, variedad cultivada, o población del género *Capsicum*.

10 La presente divulgación en un aspecto, describe una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 del Virus del moteado atenuado del pimiento (PMMoV). Una planta del género *Capsicum* según la presente divulgación puede ser cualquier especie del género *Capsicum*, incluyendo, aunque sin limitarse a, *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. cardenasei*, *C. chacoense*, *C. chinense*, *C. eximium*, *C. frutescens*, *C. microcarpum*, *C. minimum*, *C. pendulum*, *C. praetermissum* y *C. pubescens*. Preferentemente, una planta descrita en el presente documento es una especie de *Capsicum* de floración blanca, preferentemente una planta de *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, o *C. chacoense*, más preferentemente una planta de *C. annuum*, *C. frutescens* o *C. chinense*, aún más preferentemente una planta de *C. annuum* o *C. frutescens*, de la forma más preferente *C. annuum*. En una realización aún más preferente, se describen en el presente documento plantas de *C. annuum* que tienen características deseables desde el punto de vista agronómico o comercial.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “*C. annuum*” significa una planta de pimiento del género *Capsicum*, planta cuyo genoma comprende un genoma de *C. annuum* como transfondo genético. Dicha planta tendrá esencialmente un genoma de *C. annuum*, en el que como resultado de recombinación, transformación o cualquier otro proceso, se ha integrado el ADN de otras especies. El experto en la materia entenderá que la reproducción entre dos especies vegetales dará como resultado plantas que tienen características y material genético de ambos progenitores, oscureciendo de este modo la línea divisoria entre especies. Dichas plantas se denominan todas plantas de *C. annuum* en el presente documento.

30 El Tobamovirus *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV) se describió en primer lugar en *C. annuum* en Carolina del Sur, Estados Unidos en 1952 (McKinney, 1952). Los síntomas incluyen clorosis atenuada y atrofia, especialmente si las plantas resultan infectadas cuando son jóvenes. Los frutos pueden ser pequeños, estar malformados, moteados y pueden tener depresiones necróticas, lo que les hace por lo tanto no aptos para su comercialización. El PMMoV se transmite por contacto íntimo entre plantas, mediante viriones en la superficie de las semillas, y mediante injerto. El virus se ha descrito en muchos países (Argentina, Australia, Canadá, Dinamarca, Francia, Hungría, Islandia, Italia, Japón, Corea, los Países Bajos, España, Reino Unido, y los Estados Unidos). El control de la enfermedad se consigue de la mejor manera mediante la utilización de variedades cultivadas resistentes. Se han descrito nuevas cepas que, supuestamente, son capaces de superar la resistencia otorgada por los alelos L4. (Antignus y otros, 2000).

40 La resistencia al patotipo 1.2.3 del *Virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV) en plantas descritas en el presente documento se debe a la presencia del alelo de resistencia L4 en el genoma de la planta. El alelo de resistencia L4 presente en el genoma de la planta descrita en el presente documento que otorga la resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV, puede originarse de cualquier fuente. Según una realización preferente como se describe en el presente documento, el alelo de resistencia L4 se origina a partir de *C. chacoense*, más preferentemente de las entradas PI 260429 y SA 185 (Boukema, 1983).

45 Las plantas descritas en el presente documento son capaces de transmitir resistencia a PMMoV a la progenie y pueden ser heterocigóticas para el alelo de resistencia L4, pero preferentemente son homocigóticas para el alelo de resistencia L4. Las plantas descritas en el presente documento que son homocigóticas para el alelo de resistencia L4 no muestran fertilidad reducida y/o no muestran crecimiento enano.

50 Cuando las plantas no muestran fertilidad reducida y/o crecimiento enano, se infiere que bastante de la información genética que causa el fenotipo SNFD falta, o que esta información genética está suficientemente desactivada. La ausencia de la información genética responsable del fenotipo SNFD es, como mínimo, en una medida tal que el fenotipo SNFD no se expresa.

55 Los inventores de la presente invención han determinado la presencia de diversos marcadores genéticos en las proximidades del alelo L4 mediante AFLP y han descubierto que, en base a la recombinación entre marcadores o entre un marcador y el alelo L4, estos marcadores pueden dividirse en grupos distintos (véase la Tabla 1 en los Ejemplos). La posición de los diferentes grupos ligados al locus L4 se muestra en la figura 1. Se cree que los marcadores del Grupo 1 están en las proximidades más cercanas del propio alelo L4 dado que hasta el momento no se observó ninguna recombinación entre marcadores y valores resistentes en un bioanálisis del patotipo 1.2.3 de PMMoV, que indica la presencia del alelo L4. Los marcadores del Grupo 2 y el Grupo 3 están flanqueando a los marcadores del Grupo 1 en ambos lados. Un cuarto grupo comprende marcadores situados en la región que abarca tanto el Grupo 1 como el 3. Este grupo de marcadores se denomina en el presente documento como marcadores del Grupo 1/3.

Los marcadores presente en el Grupo 1/3 son distintos en que, hasta ahora, cada uno de estos marcadores no puede colocarse en el Grupo 1 o Grupo 3 dado que no se ha observado ninguna recombinación entre el marcador dado y marcadores del Grupo 1, ni entre el marcador dado y marcadores del Grupo 3. Dado que se observa recombinación entre marcadores del Grupo 1/3 y marcadores del Grupo 2, los marcadores de estos 2 grupos difieren claramente en su posición genética y la posición real de estos marcadores es el Grupo 1 o el Grupo 3.

Hasta ahora, no se observó ninguna recombinación dentro de cada uno de los grupos.

La orientación del mapa de la figura 1 hacia el resto del cromosoma es tal que los marcadores del Grupo 2 están situados centroméricos y los marcadores del Grupo 3 están situados teloméricos (hacia el extremo) en el cromosoma 11 sur. Es decir, la parte principal del alelo está situada por debajo del marcador TG036 en el cromosoma 11 (Chr. P11 (pardo)) para la población segregante PY tal como se muestra en el mapa de ligamiento de consenso intraespecífico de pimiento tal como se publica en la figura 1 de Lefebvre y otros, 2002, figura a la que se hace referencia explícita.

Se descubrió que, en plantas que eran resistentes y homocigóticas para el alelo L4 y que carecían de cualquiera de los marcadores del Grupo 2, el Grupo 3 o el Grupo 1/3, y específicamente el Grupo 2, no mostraban fenotipo SNFD. Por lo tanto, ciertas regiones genómicas que están normalmente ligadas al alelo L4 pueden sustituirse por ADN homólogo DNA de otros genotipos sin afectar a la resistencia, aunque afectando fuertemente al crecimiento y la fertilidad, así como el comportamiento de la herencia del rasgo de resistencia en plantas de la descendencia.

Las plantas sin el genotipo SNFD puede obtenerse, por ejemplo por medio de técnicas de hibridación convencionales (cruzamiento de plantas). Sin embargo, una condición es que se utilice el criterio de selección correcto. Según la presente invención un criterio de selección adecuado se ha definido a continuación, concretamente la ausencia o inactividad completa o parcial de una parte de información genética de las proximidades del alelo de resistencia L4. Según la presente invención, no es relevante cuánta de la información genética que rodea al alelo de resistencia está ausente de o está reprimida en un recombinante o de que manera el gen o los genes que otorgan el fenotipo SNFD es o están desactivados, siempre que el fenotipo SNFD esté ausente de la planta y su progenie.

Para encontrar plantas en las que haya tenido lugar recombinación entre el alelo L4 y genes que causan el fenotipo SNFD, poblaciones segregantes, o progenie de dichas poblaciones, son cribadas en la práctica para plantas que tienen un fenotipo recombinante, es decir resistencia homocigótica a P1.2.3 de PMMoV en combinación con un fenotipo no SNFD.

Aunque es posible descubrir recombinantes adecuados de esta manera, existen una serie de razones por las que el descubrimiento de recombinantes valiosos desde el punto de vista agronómico puede ser complicado. Tal como se ha dicho anteriormente, los homocigotos muestran el fenotipo SNFD. Sin embargo, se descubrió que si dichos homocigotos se cruzaran con una planta susceptible (es decir que no contenía el alelo L4) la F₁ mostraba resistencia y no mostraba SNFD. Esto parecía deberse al hecho de que el alelo de resistencia L4 es dominante, mientras que los genes responsables del fenotipo SNFD son recesivos.

La progenie de una planta con una única copia del fragmento cromosómico de *C. chacoense* combinará por lo tanto resistencia con un fenotipo normal (no SNFD). Sin embargo, su descendencia F₁ segregará para el fenotipo de resistencia y dichas plantas no pueden utilizarse con fines comerciales dado que las variedades comerciales de *Capsicum* deben cumplir estrictos requisitos de uniformidad genética para ponerlas en circulación.

A pesar de las dificultades descritas anteriormente que pueden producirse, será evidente que la selección de las plantas deseadas en las que la información genética para el fenotipo SNFD está ausente es mucho más posible de manera convencional. Esta manera de selección requiere, sin embargo, una población segregante relativamente grande o un gran número de hibridaciones para identificación.

Por lo tanto, puede ser más eficaz utilizar herramientas biológicas moleculares en la selección de plantas adecuadas. Una técnica útil es la técnica AFLP, tal como fue descrito por Vos y otros, 1995.

Cuando se aplica a la presente invención esta técnica se basa en mapear marcadores de ADN, que están genéticamente ligados al alelo L4, a partir de esto puede determinarse de manera relativamente sencilla si un suceso de recombinación se ha producido en las proximidades del alelo L4 en una progenie de un experimento de hibridación. La eficacia de la selección de plantas que combinan homocigosis para el alelo L4 con ausencia del fenotipo SNFD puede aumentar significativamente utilizando marcadores moleculares. Cuando falta un marcador ligado a L4, un entrecruzamiento entre el alelo L4 y ese marcador ha (por lo tanto) tenido lugar. Al seleccionar marcadores a diversas distancias genéticas del alelo, la posición de la recombinación puede definirse de modo que pueda determinarse si ha desaparecido mucho o poco de las proximidades del alelo. La progenie en la que uno o más de los marcadores ligados está ausente carece, por lo tanto, como mínimo de una parte de las proximidades no deseadas del alelo y tiene, por lo tanto, una probabilidad superior a la media de que un cromosoma con el alelo L4 esté presente, en el que la información genética que da como resultado el fenotipo SNFD está ausente.

El mapeo de marcadores genéticos en las proximidades de un alelo es un procedimiento que puede ser realizado de forma bastante fácil por el experto en la materia medio en técnicas de biología molecular, técnicas que se describen por ejemplo en los documentos Lefebvre y Chevre, 1995; Michelmor, 1995; Winter y Kahl, 1995. Información general relativa a la tecnología AFLP puede encontrarse en Vos y otros. (anteriormente).

Las plantas descritas en el presente documento en la realización en las que el alelo de resistencia L4 está presente en estado homocigótico y que no expresan el fenotipo SNFD pueden utilizarse adecuadamente para transferir resistencia al P1.2.3 de PMMoV a otros tipos de *Capsicum* valiosos desde el punto de vista agronómico. Las plantas de pimiento híbridas pueden producirse, por lo tanto, cruzando una planta homocigótica, preferentemente una línea consanguínea, con otra planta de pimiento. La otra planta de pimiento puede ser o no resistente al P1.2.3 de PMMoV, es preferentemente homocigótica y es aún más preferentemente una línea consanguínea.

Las plantas descritas en el presente documento en la realización en la que el alelo de resistencia L4 está presente en estado homocigótico y que no expresan el fenotipo SNFD, también pueden utilizarse para fijar la resistencia a P1.2.3 de PMMoV en otros tipos de *Capsicum* valiosos desde el punto de vista agronómico. Esto puede, por ejemplo, tener lugar por medio de procedimientos de retrocruzamiento convencionales (véase por ejemplo Briggs y Knowles, 1967), seguido por auto-polinización de las plantas durante, como mínimo, dos generaciones y la selección de líneas que son homocigóticas para el alelo de resistencia y que no expresan el fenotipo SNFD.

En etapas particulares del programa de selección, se utilizan polinizaciones cruzadas. Sin embargo, la polinización cruzada de plantas auto-polinizantes requiere que se impida la auto-fertilización en la planta que se utiliza como progenitor femenino. Esto puede conseguirse eliminando de forma manual las partes masculinas de los órganos reproductores. Esto puede realizarse mediante eliminación física de los mismos o por medio de agentes químicos y/o la utilización de agua en las flores. Todos estos procedimientos de eliminar o hacer disfuncionales las partes masculinas de los órganos reproductores son bien conocidos en la técnica. La progenie de una hibridación puede obtenerse haciendo que el progenitor femenino de la hibridación produzca semillas, recogiendo la F₁ o semilla de retrocruzamiento y sembrándola para obtener nuevas plantas. Las plantas de F₁ pueden auto-polinizarse para producir la generación de F₂ o retrocruzarse con el progenitor recurrente de un esquema de retrocruzamiento. Las plantas retrocruzadas pueden cruzarse además con el progenitor (recurrente) para mejorar el valor agronómico de las plantas en una posterior generación o pueden auto-polinizarse para producir plantas que son homocigóticas para el alelo L4 y que no expresan el fenotipo SNFD.

La presente invención se ilustra en esta solicitud en referencia a *Capsicum annuum*. Será evidente para el experto en la materia que los principios de la presente invención son aplicables del mismo modo a otras especies del género *Capsicum*, y de forma más general a plantas de la familia *Solanaceae* en las que el alelo L4 puede introducirse para otorgar resistencia a PMMoV. En principio, los diversos aspectos de la presente invención pueden referirse a todas las plantas que pueden ser afectadas por PMMoV, y los principios de la presente invención son aplicables del mismo modo a cualesquiera especies vegetales dentro del rango de hospedadores de PMMoV. En este contexto, se hace referencia especial al rango de hospedadores para PMMoV tal como se describe en la publicación en página Web que se menciona oficialmente como "Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. y Zurcher, E.J. (eds.) (1996 en adelante). "Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996" [Virus vegetales en línea: descripciones y listas de la base de datos VIDE. Versión 20 de agosto de 1996] URL: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>", pero que puede encontrarse entre otros en <http://image.fs.uidaho.edu/vide/refs.htm>. En este contexto, también deben mencionarse Dallwitz, 1980 y Dallwitz y otros, 1993. La referencia a *C. annuum* no debe interpretarse, por lo tanto, como una limitación de la presente invención.

Además de las propias plantas de *Capsicum*, y las partes de las mismas adecuadas para el consumo, tales como los frutos, se describen en el presente documento partes de la planta adecuadas para propagación. Tal como se ha descrito anteriormente, la divulgación no está limitada a partes de la planta de plantas de *Capsicum*, sino que se refiere a partes de cualquier planta dentro del rango de hospedadores de PMMoV. Los ejemplos de partes adecuadas para propagación son tejidos de órganos, tales como semillas, hojas, tallos, raíces, brotes y similares, protoplastos, embriones somáticos, anteras, peciolos, células en cultivo y similares. Las plantas descritas en el presente documento pueden cultivarse o propagarse de la manera convencional pero también por medio de técnicas de cultivo tisular de partes de plantas.

Un procedimiento descrito en el presente documento para producir una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV comprende la etapa de proporcionar una planta receptora adecuada del género *Capsicum* que es susceptible al patotipo 1.2.3 de PMMoV.

Un procedimiento descrito en el presente documento para producir una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV comprende, además, la etapa de introducir en dicha planta receptora un alelo de resistencia L4, por ejemplo de una planta donadora, alelo de resistencia L4 que otorga resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV a dicha planta receptora.

Un procedimiento descrito en el presente documento para producir una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV puede comprender, además, la etapa de producir una población segregante a partir de dicha planta resistente.

5 Un procedimiento descrito en el presente documento para producir una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV puede comprender, además, la etapa de producir una progenie de sustancialmente cada planta de dicha población segregante. Una progenie o descendencia puede producirse permitiendo que dicha planta produzca semillas, por ejemplo cruzando o autofertilizando dicha planta, y cultivando dicha semilla para dar una nueva planta. Como alternativa, puede obtenerse una progenie utilizando otras técnicas
10 adecuadas. Dichas alternativas son bastante habituales en el área de reproducción de plantas.

Un procedimiento descrito en el presente documento para producir una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV comprende la etapa de seleccionar entre, como mínimo, una de dichas
15 progenies una planta en cuyo genoma el alelo de resistencia L4 está presente y en cuyo genoma la información genética responsable del fenotipo SNFD está ausente, como mínimo, en una medida tal que el fenotipo SNFD no se expresa.

La presencia del alelo de resistencia L4 en el genoma de las plantas descritas en el presente documento puede ser el resultado de cualquier causa, natural o artificial, y puede ser, por ejemplo, el resultado de introgresión, ingeniería
20 genética (transformación) o fusión de protoplastos.

La introgresión de uno o más genes que codifican resistencia L4 desde una planta donadora a una planta receptora que es no resistente o que posee niveles bajos de resistencia a PMMoV puede conseguirse utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, uno o más genes que codifican resistencia a PMMoV, es decir el alelo L4, pueden
25 introgresarse en una planta de pimiento receptora que es no resistente o una planta que tiene niveles bajos de resistencia a PMMoV utilizando técnicas de reproducción tradicionales, opcionalmente en combinación con procedimientos de cribado molecular, por ejemplo utilizando marcadores.

Las técnicas de reproducción tradicionales pueden utilizarse adecuadamente para introgresar uno o más genes que codifican resistencia a PMMoV de una planta donadora a una planta receptora que es no resistente o que tiene un bajo nivel de resistencia a PMMoV. Estos procedimientos implican cruzamiento tradicional de especies, variedades o variedades cultivadas, siempre que dichas especies, variedades o variedades cultivadas puedan cruzarse entre sí. Puede utilizarse una especie puente cuando las especies donadora y receptora proyectadas solamente pueden
30 cruzarse entre sí en una medida limitada.

En un procedimiento de reproducción tradicional, que se denomina como reproducción de árbol genealógico, una primera planta de pimiento que muestra resistencia a PMMoV y contiene el alelo L4 que codifica resistencia a PMMoV se cruza con una segunda planta de pimiento que es no resistente a PMMoV o posee niveles bajos de resistencia a PMMoV y que muestra características deseables desde el punto de vista agronómico o comercial, tales como, aunque sin limitación, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas del fruto, etc. A la población vegetal resultante (es decir la F₁) se le permite a continuación que se auto-polinice y produzca semillas (semillas de F₂).
40

Las plantas de F₂ cultivadas a partir de las semillas de F₂ se criban a continuación para resistencia a PMMoV. La población puede cribarse de una serie de maneras diferentes. En primer lugar, la población puede cribarse utilizando una criba de enfermedad de patología tradicional también denominada un bioanálisis de resistencia en el presente documento. Dichos bioanálisis para PMMoV son conocidos en la técnica. Específicamente, las plantas individuales o partes de las mismas pueden estimularse en una incubadora o invernadero con PMMoV y los fenotipos resistentes o susceptibles resultantes de cada planta se valoran. A modo de ejemplo, y no de limitación, pueden cribarse plantas en un invernadero de la siguiente manera: Pueden cultivarse plantas de pimienta a partir de semillas de F₂ en un invernadero en condiciones de cultivo aplicadas generalmente para su cultivo y conocidas por el experto en la materia, por ejemplo a una temperatura de 22°C durante el día y 20°C durante la noche, en condiciones de iluminación de verano normales. Las plantas de F₂ pueden cultivarse por ejemplo en bandejas que también contienen plantas de control, tales como una o más plantas resistentes y una o más plantas susceptibles. Dado que pueden utilizarse hojas infectadas con un inóculo, que pueden almacenarse congeladas. Un inóculo que comprende el virus de ensayo puede prepararse triturando las hojas infectadas con agua (por ejemplo 1 g de hoja congelada en 100 ml de agua) y añadiendo carborundo (carburo de silicio). La inoculación de la planta de ensayo puede realizarse por ejemplo frotando el inóculo sobre un área de la superficie (por ejemplo mínima 3,5 x 2 cm) de la primera hoja verdadera de la planta utilizando una esponja. Después de una primera observación, las plantas que son visiblemente susceptibles (síntomas visibles son un mosaico sistémico) pueden eliminarse. Durante una segunda observación una semana después, puede contarse el número de plantas susceptibles y resistentes. Para un ensayo de hojas, las hojas (4-5 cm de la parte superior de la planta) pueden colocarse en una bandeja que contiene papel de filtro húmedo y se colocan hojas encima del papel de filtro. Se añaden controles susceptibles y resistentes a la bandeja y la bandeja puede envolverse en plástico e incubarse a 20°C a un régimen de luz de 16 horas/día. La inoculación puede producirse tal como se ha descrito anteriormente con una esponja y la evaluación se produce después de 6-8 días.
50
55
60
65

Como alternativa, pueden realizarse procedimientos de reproducción tradicionales en combinación con procedimientos de cribado molecular. Dichos procedimientos se denominan habitualmente como una selección asistida por marcadores o reproducción asistida por marcadores e implican la utilización de uno o más de los marcadores moleculares para identificar aquellas plantas de la descendencia que contienen uno o más de los genes que codifican el rasgo deseado (es decir, el alelo L4, o la forma truncada del mismo). La constitución genética del genoma predice el fenotipo de la planta y los bioanálisis prolongados se vuelven innecesarios. La selección asistida por marcadores también puede utilizarse para confirmar los resultados obtenidos a partir de la criba del bioanálisis. Las plantas híbridas de F2 que muestran un fenotipo resistente a PMMoV contienen los genes deseados que codifican resistencia a PMMoV, y aquellos que poseen adicionalmente características deseables desde el punto de vista comercial se seleccionan a continuación y se autofertilizan durante una serie de generaciones para permitir que la planta de pimiento se vuelva cada vez más consanguínea. El resultado de dicha reproducción y selección es la producción de líneas que son genéticamente homogéneas para los genes asociados con resistencia a PMMoV así como otros genes asociados con rasgos de interés comercial.

Se describe en el presente documento un procedimiento de producción de una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una primera planta del género *Capsicum* que es susceptible al patotipo 1.2.3 de PMMoV, o una parte de la misma;

b) proporcionar una segunda planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV debido a la presencia del alelo de resistencia L4 en el genoma de dicha planta;

c) cruzar dichas primera y segunda plantas para producir plantas de la progenie que muestran resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV, y

d) cribar adicionalmente el genoma de dichas plantas de la progenie resistentes para la presencia de un alelo de resistencia L4 truncado en el que dicho alelo comprende información genética que otorga resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV a dicha planta de la progenie, y en el que la información genética que otorga el fenotipo SNFD está ausente de dicho alelo como mínimo en una medida tal que el fenotipo SNFD no se expresa.

En realizaciones preferentes de este procedimiento, el cribado en la etapa d) se realiza evaluando la ausencia de, como mínimo, un marcador del alelo de resistencia L4 seleccionado entre el grupo que comprende marcadores del Grupo 2, marcadores del Grupo 1/3 y marcadores del Grupo 3 tal como se muestra en la figura 3, preferentemente marcadores del Grupo 2 tal como se muestra en la figura 3.

Según un procedimiento descrito en el presente documento, las características deseables desde el punto de vista comercial seleccionadas incluyen la ausencia del fenotipo SNFD, lo que significa que las plantas son no segregantes, fértiles y muestran crecimiento normal, cuando se comparan con variedades comerciales de *Capsicum* que son no resistentes al patotipo 1.2.3 de PMMoV. Estas características pueden identificarse en una planta mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, características de crecimiento normal pueden identificarse mediante inspección visual del rendimiento de crecimiento en el que la ausencia de crecimiento enano indica un crecimiento normal. La fertilidad puede evaluarse mediante inspección visual de la cantidad de semillas y/o polen. Un fenotipo no segregante puede evaluarse mediante la evaluación de los resultados de ensayo de la criba de resistencia sobre semillas de F₁ del cruzamiento (resistente x susceptible) tal como se ha descrito anteriormente.

Como alternativa, la ausencia del fenotipo SNFD puede evaluarse cribando las plantas para la ausencia de marcadores específicos. En una realización particularmente preferente de plantas y procedimientos descritos en el presente documento, uno o más de los marcadores del Grupo 2 tal como se describen en el presente documento están ausentes. Un procedimiento descrito en el presente documento para producir una planta del género *Capsicum* que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV, por lo tanto, en una realización preferente comprende la etapa de seleccionar, a partir de, como mínimo, una de las progenies de una población segregante de una planta resistente, una planta en cuyo genoma uno o más, preferentemente todos, los marcadores del Grupo 1, tal como se describen en el presente documento, están presentes, y en cuyo genoma uno o más marcadores del Grupo 2, tal como se describen en el presente documento, están ausentes.

En otra realización de una planta descrita en el presente documento, uno o más de los marcadores del Grupo 3, tal como se describen en el presente documento, están ausentes. En otra realización más de una planta descrita en el presente documento, uno o más de los marcadores del Grupo 1/3 tal como se describen en el presente documento están ausentes. En este contexto debe entenderse que la ausencia de uno o más marcadores del Grupo 1/3 está relacionada solamente con aquellos marcadores que no están ubicados en la región genómica que es responsable de la resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV, dado que la ausencia de dicha información no daría como resultado una planta que muestra resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV debido a la presencia del alelo de resistencia L4 en el genoma de esa planta. Por lo tanto, la ausencia de uno o más marcadores del Grupo 1/3 se refiere preferentemente solamente a aquellos marcadores ubicados en la región correspondiente a la de los marcadores del Grupo 3, preferentemente no se refiere a la de los marcadores del Grupo 1. En una realización la más preferente, el alelo L4

está truncado de modo que uno o más marcadores del Grupo 2 están ausentes. En este caso, el truncamiento es centromérico, mientras que en el caso del truncamiento de un marcador del Grupo 3, el truncamiento es telomérico. En otra realización la más preferente, el truncamiento es tal que el marcador TG036 (Lefebvre y otros, 2002; Ben-Chaim y otros, 2001) (un miembro de los marcadores del Grupo 2) está ausente.

La ausencia del fenotipo SNFD en plantas provistas del alelo L4 puede alcanzarse de este modo introduciendo en plantas una forma truncada de la introgresión de *C. chacoense* que comprende el alelo L4, en el presente documento también denominado un alelo L4 truncado. El grado de truncamiento puede ser determinado fácilmente por el experto en la materia. Por ejemplo, un nivel adecuado de truncamiento puede conseguirse mediante la eliminación parcial o completa, mediante procedimiento transgénicos o mediante un proceso de recombinación y selección, de una cualquiera de esas regiones de la introgresión que comprenden los marcadores del Grupo 2, el Grupo 3, y/o el Grupo 1/3, siempre que cuando se eliminan regiones que comprenden marcadores del Grupo 1/3, solamente puedan eliminarse aquellas partes que no albergan la información que es responsable de la resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV. Preferentemente, dicho truncamiento implica la eliminación parcial o completa de regiones de la introgresión de *C. chacoense* que comprende el alelo L4 que comprenden los marcadores del Grupo 2. Por lo tanto, la eliminación de una región que comprende uno o más marcadores del Grupo 2, mediante procedimientos transgénicos o mediante un proceso de recombinación y selección, dará como resultado una planta que ya no expresa el fenotipo SNFD. De la forma más preferente, este truncamiento da como resultado la eliminación del marcador TG036 (Lefebvre y otros, 2002; Ben-Chaim y otros, 2001).

El nivel de truncamiento también puede definirse como una distancia genética. La distancia genética se mide mediante la frecuencia de entrecruzamiento entre loci en el mismo cromosoma. Cuanto más alejados estén dos loci, más probable es que se produzca un cruzamiento entre ellos. A la inversa, si dos loci están muy juntos, es menos probable que se produzca un cruzamiento entre ellos. Los loci pueden estar indicados por los marcadores de los diversos grupos de marcadores definidos en el presente documento. Como norma, un centimorgan (cM) es igual al 1% de recombinación entre loci (marcadores). El nivel de truncamiento que da como resultado la ausencia de uno o más marcadores del Grupo 2, el Grupo 3 y/o el Grupo 1/3, puede ser adecuadamente de 0,001-10 cM, más preferentemente 0,01-10 cM. Como alternativa, la distancia genética entre un marcador que indica la presencia de la introgresión (por ejemplo uno o más marcadores del Grupo 1) y un marcador que está truncado puede ser adecuadamente de 0,001-10 cM, más preferentemente 0,01-10 cM.

Una línea de planta de pimiento consanguínea resistente a PMMoV nueva y superior también puede desarrollarse utilizando la técnica de selección y retrocruzamiento recurrente. En este procedimiento, la resistencia L4 puede introgresarse en una planta receptora diana (que se denomina el progenitor recurrente) cruzando el progenitor recurrente con una primera planta donadora (que es diferente del progenitor recurrente y se denomina en el presente documento como el "progenitor no recurrente"). El progenitor recurrente es una planta que es no resistente o tiene un bajo nivel de resistencia a PMMoV y posee características deseables desde el punto de vista comercial, tales como, aunque sin limitarse a resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas del fruto, etc., y en el que el fenotipo SNFD está ausente. Los procedimientos de retrocruzamiento se aplican ampliamente para cruzar genes de un "progenitor donador" en un trasfondo genético con un alto valor agronómico. En general, la introgresión de un gen dominante en un fenotipo aceptable desde el punto de vista agronómico puede conseguirse mediante 3-5 retrocruzamientos, seguidos de por ejemplo 2-3 autopolinizaciones, donde en todas las etapas se ejecuta la selección para valor agronómico. El progenitor no recurrente muestra resistencia a PMMoV y contiene el alelo de resistencia L4. El progenitor no recurrente o planta donadora puede ser cualquier variedad o línea consanguínea de la planta que es fértil en cruzamiento con el progenitor recurrente o planta receptora diana. La progenie que resulta de un cruzamiento entre el progenitor recurrente y el progenitor no recurrente se retrocruza con el progenitor recurrente. La población vegetal resultante se criba a continuación. La población puede cribarse en una serie de maneras diferentes. En primer lugar, la población puede cribarse utilizando una criba de patología tradicional tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En segundo lugar, puede realizarse selección asistida por marcadores utilizando uno o más de los marcadores moleculares descritos anteriormente en el presente documento para identificar aquellas progenies que contienen el alelo de resistencia L4 y de las cuales uno o más de los marcadores asociados con el fenotipo SNFD están ausentes. Como alternativa, puede utilizarse selección asistida por marcadores para confirmar los resultados obtenidos de la criba de bioanálisis de resistencia.

Una vez realizadas las selecciones apropiadas, el proceso se repite. El proceso de retrocruzamiento con el progenitor recurrente y selección para resistencia a PMMoV y ausencia del fenotipo SNFD (o marcadores asociados con él) se repite para aproximadamente cinco o más generaciones. La progenie que resulta de este proceso es heterocigótica para el alelo L4. La generación del último retrocruzamiento se autofertiliza a continuación para proporcionar progenie de línea pura homocigótica que comprende resistencia a PMMoV otorgada por el alelo L4 y carece del fenotipo SNFD.

Las líneas de pimiento consanguíneas resistentes a PMMoV descritas en el presente documento que son homocigóticas para el alelo L4 y que no expresan el fenotipo SNFD pueden utilizarse en cruzamientos adicionales para crear plantas híbridas resistentes a PMMoV. Por ejemplo, una primera planta de pimiento consanguínea resistente a PMMoV puede cruzarse con una segunda planta de pimiento consanguínea que posee rasgos deseables

desde el punto de vista comercial tales como, aunque sin limitarse a, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características deseables del fruto, etc. Esta segunda línea de pimiento consanguínea puede ser o no resistente a PMMoV.

5 Los procedimientos de selección utilizados en aspectos de la presente invención pueden implicar la provisión de una muestra de ácido nucleico, preferentemente ADN, de plantas, tal como puede obtenerse utilizando procedimientos de
 10 aislamiento de ácido nucleico bien conocidos en la técnica, y ensayando la secuencia de dicho ácido nucleico para la presencia o ausencia de marcadores. Los marcadores tal como se definen en el presente documento son marcadores de AFLP que pueden detectarse realizando la reacción de AFLP que condujo a su definición o, como alternativa,
 15 realizando una reacción de amplificación, tal como PCR, con uno o más conjuntos de marcador-cebadores específicos que, en condiciones en las que dichos cebadores puedan hibridar con su plantilla específica, son capaces de producir un producto de amplificación específico. La presencia de un producto de amplificación específico indica a continuación la presencia del marcador en la secuencia plantilla, mientras que la ausencia de un producto de amplificación indica la ausencia del marcador. Para confirmar la presencia de la introgresión de L4 (el alelo L4) uno o más de,
 20 preferentemente todos, los marcadores del Grupo 1, de la forma más preferente el marcador E58/M50-F-580 y/o el marcador E54/M55-F-101, tal como se describe en el presente documento, se detectan en la muestra de ácido nucleico. Para confirmar la presencia de un alelo truncado apropiadamente, preferentemente uno o más marcadores del Grupo 2, tal como se describen en el presente documento, están ausentes. Algunos de los marcadores de AFLP también pueden convertirse en marcadores de sitio marcados con secuencia, lo que permite un cribado rápido y conveniente de la progenie de los cruzamientos (Werner y otros, 2001).

Como alternativa, un procedimiento de cribado para la presencia o ausencia de marcadores de L4 en el genoma de una muestra de una planta, puede comprender poner en contacto una muestra de ácido nucleico de una planta con una sonda que se une selectivamente a una secuencia de polinucleótidos diana en una región cromosómica que
 25 comprende una o más secuencias marcadoras, en el que la sonda se pone en contacto con la muestra en condiciones en las que la sonda se une selectivamente con la secuencia de polinucleótidos diana para formar un complejo de hibridación estable; y detectar la presencia o ausencia de un complejo de hibridación, cribando de este modo para la presencia o ausencia de dichos marcadores en la planta.

30 La selección asistida por marcadores utilizada en los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento puede realizarse, por ejemplo, por etapas, con lo cual la presencia del alelo L4 y la ausencia del fenotipo SNFD se seleccionan en más de una generación. La selección asistida por marcadores para resistencia otorgada por el alelo L4 puede realizarse antes, junto con, o después del ensayo y la selección para otros rasgos deseables desde el punto de vista comercial tales como resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características deseables del fruto, etc. Del mismo modo, el orden en el que se evalúa la resistencia a PMMoV o la ausencia del fenotipo SNFD no es particularmente limitante. Debe entenderse que la exclusión (preferentemente asistida por marcadores) de plantas que comprenden información genética que otorga el fenotipo SNFD puede realizarse antes de la selección (preferentemente asistida por marcadores) de plantas resistentes a PMMoV, o incluso simultáneamente.

40 Una fuente de material a partir de la que puede aislarse el alelo L4 de su entorno circundante de forma natural, obteniendo de este modo solamente la información genética que otorga la resistencia de L4 y no la información genética que otorga el fenotipo SNFD, es por ejemplo a partir de una planta de las entradas de *C. chacoense* PI 260429 o SA 185 (Boukema, 1983). Dichas entradas están, por ejemplo, disponibles del grupo Plant Genetic Resources (PGR) [recursos genéticos vegetales] del Centre for Genetic Resources, the Netherlands (CGN) [centro para recursos genéticos, Países Bajos], Wageningen, Países Bajos.

Una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende un alelo de resistencia L4 truncado como se describe en el presente documento puede producirse por ejemplo aislando ADN de una planta que es resistente al patotipo 1.2.3 de PMMoV y aislando a partir de dicho ADN un alelo de resistencia L4. Dicho aislamiento puede conseguirse, por ejemplo, amplificando la región genética que comprende la parte que otorga resistencia a PMMoV de dicho alelo L4, por ejemplo utilizando cebadores directos e inversos adecuados. Los cebadores adecuados son, por ejemplo, aquellos utilizados para la definición de marcadores del Grupo 2, junto con marcadores utilizados para la definición de marcadores del Grupo 3. El tamaño del fragmento de amplificación puede reducirse utilizando o desarrollando otros cebadores que hibridan en ubicaciones del genoma de *C. chacoense* que están menos alejadas, por ejemplo más cercanas a la posición de los marcadores del Grupo 1. De esta manera, puede conseguirse que la información genética que otorga el fenotipo SNFD esté ausente del alelo L4. El experto en la materia es consciente de los diversos elementos reguladores que deben estar presentes en dicho ácido nucleico para que sea expresado en una planta del género *Capsicum*, otorgando de este modo resistencia al patotipo 1.2.3 de PMMoV a dicha planta.

60 El alelo L4 o el gen L4 puede aislarse, por ejemplo, también proporcionando una muestra de ADN genómico de una planta de *Capsicum* que utiliza procedimientos de aislamiento de ADN estándar bien conocidos en la técnica. Se requiere para recuperar grandes fragmentos de ADN que la calidad del aislado sea relativamente alta, es decir, que esencialmente se evite la degradación grave del ADN genómico. Generalmente, puede obtenerse ADN de suficiente longitud si se emplean técnicas de aislamiento para obtener preparaciones de ADN de alto peso molecular (APM). El ADN APM es ADN que se obtiene bajo protección de cizalladura física durante la preparación. La preparación de ADN APM a partir de de tejido vegetal de *Capsicum* puede implicar, por ejemplo, aislar protoplastos utilizando hidrólisis de

la pared celular e incluir los protoplastos en agarosa. Un procedimiento alternativo es preparar ADN APM a partir de núcleos de plantas. El aislamiento de ADN en megabases se ha llevado a cabo con éxito para un gran número de especies vegetales y dichos procedimientos actualmente se aplican habitualmente para proporcionar ADN en tamaño de megabases adecuados para construir grandes bibliotecas de insertos de ADN en vectores de clonación del cromosoma artificial bacteriano (BAC) y el cromosoma artificial de levadura (YAC). Una vez que el ADN genómico está aislado, puede tratarse por ejemplo utilizando las enzimas de restricción, utilizadas en reacciones de amplificación por PCR o puede clonarse o sondearse con cualquiera de las secuencias marcadoras que se dan a conocer en el presente documento.

La presente divulgación contempla además la inserción de dichos genes (o alelos) aislados o purificados en pimiento u otras plantas utilizando técnicas conocidas en la técnica para proporcionar plantas transgénicas que muestran resistencia a infección por PMMoV. La transformación de plantas implica la construcción de un vector de expresión que funcionará en células vegetales. En la presente divulgación, tal vector comprende ADN que comprende un gen que codifica resistencia a PMMoV que está bajo el control de o unido de forma operativa a un elemento regulador, tal como un promotor. El vector de expresión puede contener una o más de dichas combinaciones de gen/elemento regulador unidos de forma operativa, siempre que, como mínimo, uno de los genes contenidos en las combinaciones codifique resistencia a PMMoV. El vector o vectores pueden estar en forma de un plásmido, y puede utilizarse, en solitario o en combinación con otros plásmidos, para proporcionar plantas transgénicas que son resistentes a PMMoV, utilizando procedimientos de transformación conocidos en la técnica, tales como el sistema de transformación de *Agrobacterium*.

Los vectores de expresión pueden incluir, como mínimo, un marcador genético, unido de forma operativa a un elemento regulador (tal como un promotor) que permite que células transformadas que contienen el marcador sean recuperadas mediante selección negativa (inhibiendo el crecimiento de células que no contienen el gen marcador seleccionable), o mediante selección positiva (mediante cribado para el producto codificado por el marcador genético). Se conocen en la técnica muchos genes marcadores seleccionables utilizados habitualmente para transformación de plantas, e incluyen, por ejemplo, genes que codifican enzimas que detoxifican metabólicamente un agente químico selectivo que puede ser un antibiótico o un herbicida, o genes que codifican una diana alterada que es insensible al inhibidor. En la técnica se conocen varios procedimientos de selección positiva, tales como selección por manosa. Como alternativa, puede utilizarse transformación sin marcadores para obtener plantas sin genes marcadores mencionados, para lo cual en la técnica se conocen técnicas.

Un procedimiento para introducir un vector de expresión en una planta se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium* (véase por ejemplo Horsch y otros, 1985). *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo patógenas para plantas que transforman genéticamente células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta (véase por ejemplo Kado, 1991). Los procedimientos de introducción de vectores de expresión en tejido vegetal incluyen la infección directa o co-cultivo de células vegetales con *Agrobacterium tumefaciens*, Horsch y otros, 1985). Las descripciones de sistemas vectores de *Agrobacterium* y procedimientos para transferencia génica mediada por *Agrobacterium* son dados a conocer por Gruber y Crosby, 1993 y Moloney y otros, 1989. Véase también, la Patente de Estados Unidos No. 5.591.616. Descripciones generales de vectores de expresión en plantas y genes informadores y protocolos de transformación y descripciones de sistemas de vectores de *Agrobacterium* y procedimientos para transferencia génica mediada por *Agrobacterium* pueden encontrarse en Gruber y Crosby, 1993. Procedimientos generales de cultivo de tejidos vegetales son dados a conocer, por ejemplo, por Miki y otros, 1993 y por Phillips y otros, 1988. Un manual de referencia apropiado para técnicas de clonación molecular y vectores de expresión adecuados es Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis. Molecular Cloning: a Laboratory Manual [Clonación molecular: un manual de laboratorio] (3ª edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y., 2000.

Otro procedimiento para introducir un vector de expresión en una planta se basa en transformación mediada por microproyectiles en la que el ADN es portado sobre la superficie de microproyectiles. El vector de expresión se introduce en tejidos vegetales con un dispositivo biobalístico que acelera los microproyectiles a velocidades de 300 a 600 m/s lo que es suficiente para penetrar paredes y membranas celulares vegetales (Véase, Sanford y otros, 1987, 1993; Sanford, 1988, 1990; Klein y otros, 1988, 1992). Otro procedimiento para introducir ADN en plantas es mediante la sonicación de células diana (Véase, Zhang y otros, 1991). Como alternativa, se ha utilizado la fusión de liposomas o esferoplastos para introducir vectores de expresión en plantas (Véase por ejemplo Deshayes y otros, 1985 y Christou y otros, 1987). La captación directa de ADN en protoplastos utilizando precipitación con CaCl_2 , alcohol polivinílico o poli-L-ornitina también se ha descrito (Véase por ejemplo, Hain y otros, 1985 y Draper y otros, 1982). También se ha descrito la electroporación de protoplastos y células completas y tejidos (D'Halluin y otros, 1992 y Laursen y otros, 1994).

Después de la transformación de tejidos diana de pimiento, la expresión de los genes marcadores seleccionables descritos anteriormente permite la selección preferencial de células, tejidos y/o plantas transformadas, utilizando procedimientos de regeneración y selección actualmente bien conocidos en la técnica.

Los anteriores procedimientos para transformación podrían utilizarse para producir plantas de pimiento transgénicas u otras especies vegetales, tales como, aunque sin limitarse a una especie de la familia *Solanaceae*. Tal como se ha

indicado anteriormente, los diversos aspectos de la presente divulgación pueden referirse, en principio, a todas las plantas que pueden resultar afectadas por PMMoV y, de este modo, pueden producirse plantas transgénicas como se describe en el presente documento en cualquier especie vegetal dentro del rango de hospedadores de PMMoV.

5 Dichas plantas transgénicas pueden cruzarse a continuación, con otra planta (no transformada o transformada), para producir un híbrido transgénico de pimiento u otra especie vegetal que es resistente a la infección por PMMoV. Como alternativa, los genes extraños (heterólogos) para resistencia a PMMoV en un pimiento u otra especie vegetal transgénica que ha sido manipulada para contener el gen o genes extraños (heterólogos u homocigóticos) que codifican resistencia a PMMoV utilizando las técnicas de transformación descritas en el presente documento podrían moverse a otra planta utilizando técnicas de reproducción tradicionales (tales como retrocruzamiento), que son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, y tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el retrocruzamiento podría utilizarse para introgresar resistencia a PMMoV de un pimiento u otra línea vegetal consanguínea resistente a PMMoV transgénica que contiene un gen extraño (heterólogo) que codifica resistencia a PMMoV y que no contiene la información genética responsable del fenotipo SNFD a una planta de pimiento u otro cultivo no resistente que no contiene ese gen, o desde una planta de pimiento u otra planta resistente a PMMoV híbrida transgénica que contiene un gen extraño que codifica resistencia a PMMoV a una línea (s) que no contiene ese gen.

Por ejemplo, la fusión de protoplastos puede utilizarse para crear plantas resistentes a PMMoV nuevas y superiores. Más específicamente, un primer protoplasto puede obtenerse de una planta de pimiento u otra línea vegetal que muestra resistencia a infección por PMMoV y que no contiene la información genética responsable del fenotipo SNFD. Un segundo protoplasto puede obtenerse de una segunda variedad de pimiento u otra planta que contiene características deseables desde el punto de vista comercial, tales como, aunque sin limitarse a, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas del fruto, etc. Los protoplastos se fusionan a continuación utilizando procedimientos de fusión de protoplastos tradicionales que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la fusión del protoplasto puede conseguirse empleando una solución de polietilenglicol (PEG) para facilitar la fusión de las membranas. Dicha hibridación somática puede realizarse en las condiciones dadas a conocer por Sundberg y *otros*, 1986, para la producción de híbridos interespecíficos o modificaciones de los mismos. Sin embargo, un experto en la materia reconocería que la fusión de protoplastos puede conseguirse de otras maneras diferentes de utilizando polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, los protoplastos pueden fusionarse utilizando técnicas de fusión inducidas por campo eléctrico tal como se divulga por Koop y Spangenberg, 1989. Adicionalmente, la fusión del protoplasto puede conseguirse con dextrano y alcohol polivinílico. Procedimientos adicionales para fusión de protoplasto pueden encontrarse en Gleba y *otros*, 1984 y en Dodds y Roberts, 1995.

A modo de ejemplo, y no de limitación, a continuación se proporcionarán Ejemplos de la presente invención.

Ejemplos

Se produjeron dos líneas parentales consanguíneas, llamadas progenitor masculino de Sylvia (línea consanguínea de la variedad S&G "Cuby") y progenitor masculino de Manito (línea consanguínea de la variedad S&G "Tasty"). Ambas variedades Sylvia y Manito segregaban inicialmente para resistencia a PMMoV. Mediante la selección de plantas y cruzamientos prueba fue posible fijar resistencia en ambas variedades. Sin embargo, se observó que rasgos como esterilidad masculina no estable/mala fertilidad y crecimiento enano estaban presentes en los progenitores masculinos de ambas variedades.

45 El patotipo 1.2.3 de PMMoV que se utiliza en estos Ejemplos es un aislado de virus con características similares al aislado P14 mencionado por Boukema, 1982. En los siguientes Ejemplos, el aislado de virus utilizado en los diversos experimentos fue recibido de PTG (Proefstation voor Tuinbouw onder Glas), ahora PPO, en Naaldwijk, Países Bajos, y se propagó mecánicamente.

50 Ejemplo 1. Marcadores de resistencia L4 en plantas de pimiento resistentes y susceptibles dentro de la misma variedad.

Un mapa de ligamiento del locus L4 fue producido por Keygene (Wageningen, Países Bajos). La región en la que el locus L se mapeaba estaba ubicada en el telómero del cromosoma 11-sur (Lefebvre y *otros*, 2002).

55 Los marcadores alrededor de este locus podían dividirse en cuatro grupos. La posición de los diferentes grupos ligados al locus L4 se muestra en la figura 1. Cada grupo contiene una serie de marcadores, dentro de cada grupo no se descubrió recombinación. La orientación del mapa de ligamiento hacia el resto del cromosoma se desconoce. Los marcadores presentes dentro de cada grupo se muestran en la Tabla 1.

60

Tabla 1: Visión general de los marcadores dentro de los grupos respectivos.

Grupo 1 (específico del alelo L4)	Grupo 1/3	Grupo 3	Grupo 2
E39/M58-F-95	E63/M61-F-501	E60/M54-F-447	E35/M49-F-90
E54/M55-F-101	E66/M43-F-387		E39/M58-F-65
E58/M60-F-255	E66/M49-F-387		E39/M51-F-380
E58/M50-F-580	E66/M61-F-99		E58/M62-F-168
	E67/M50-F150		E66/M54-F-600
	E67/M62-F-214		TG036
	E70/M54-F-133		
	E71/M47-F-550		
	E74/M61-F-385		

5 A partir de las variedades segregantes Manito y Sylvia, plantas de la F₁ así como líneas parentales resistentes se ensayaron en un bioanálisis, bastante similar al descrito anteriormente. En total, una bandeja estaba constituida por 35 plantas de ensayo, incluyendo un control susceptible y un control resistente. Los bioanálisis de ensayo de tallo y hojas se realizaron esencialmente tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados del bioanálisis se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados de bioanálisis en variedades Sylvia y Manito y sus líneas progenitoras resistentes

Nombre	No. de plantas resistentes	No. de plantas susceptibles	No. de ensayo en el ensayo del marcador
Manito	14	11	23-28
Padre de Manito	20	0	29-33
Sylvia	19	11	34-39
Padre de Sylvia	20	0	40-44

10 A partir del bioanálisis mostrado en la Tabla 2, se eligieron aleatoriamente 3 plantas resistentes y 3 susceptibles de las plantas de la F₁ de ambas variedades segregantes Manito y Sylvia, así como se seleccionaron aleatoriamente 5 plantas de sus progenitores masculinos correspondientes. Las plantas elegidas se analizaron adicionalmente con 4 marcadores, enumerados en la Tabla 1, ligados al locus L4. No todos los marcadores, enumerados en la tabla 1, fueron identificados en el momento en el que se realizó el ensayo. De cada variedad, las tres plantas resistentes y las tres susceptibles se analizaron ensayando para la presencia de los diversos marcadores. A partir del progenitor resistente correspondiente, se analizaron cinco plantas. Los resultados del análisis de marcadores se enumeran en la tabla 3.

20 Tabla 3: Valores del marcador (dominantes, véase el texto) de plantas seleccionadas a partir del bioanálisis

Número	Manito							Progenitor masculino de manito						Sylvia						Progenitor masculino de Sylvia			
	R ₂₃	R ₂₄	R ₂₅	S ₂₆	S ₂₇	S ₂₈	R ₂₉	R ₃₀	R ₃₁	R ₃₂	R ₃₃	R ₃₄	R ₃₅	R ₃₆	S ₃₇	S ₃₈	S ₃₉	R ₄₀	R ₄₁	R ₄₂	R ₄₃	R ₄₄	
Fenotipo	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	
Marcadores L4 (grupo)																							
E39/M58-F-95 (1)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
E39/M58-F-65 (2)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
E58/M50-F-580 (1)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
E58/M60-F-255 (1)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	

Los números corresponden al número de ensayo en el ensayo de marcadores; R, resistente; S, susceptible; +, presente; -, ausente

25 Tal como puede verse a partir de la Tabla 3, todos los marcadores ligados al alelo L4 estaban presentes en plantas de la F₁ que mostraban resistencia fenotípica en el bioanálisis (R). En las plantas susceptibles (S) sin embargo, ninguno de los marcadores L4 estaba presente. Los progenitores masculinos resistentes de Manito (No. 29-33) y Sylvia (No. 40-44) no mostraron ninguna segregación en el bioanálisis y todos los marcadores ligados al alelo L4 estaban presentes en estas plantas. Dado que los marcadores se valoraron únicamente como presente o ausente (dominante), no podía concluirse si el segmento de introgresión estaba presente homocigótico o heterocigótico. Se concluyó que la susceptibilidad en la F₁ es causada por la ausencia de la introgresión de L4. Ensayos adicionales mostraron que efectos maternos en la herencia de resistencia L4 estaban ausentes.

Ejemplo 2. Desarrollo de variedad Sylvia no segregante.

35 Para desarrollar una variedad Sylvia no segregante, plantas individuales de la línea parental resistente (línea 4578) se cruzaron con plantas del progenitor susceptible. La aparición de segregación de la resistencia L4 se evaluó en las poblaciones F₁ individuales resultantes. Los resultados se enumeran en la Tabla 4.

La línea 6636 se obtuvo mediante autofertilización de la planta no. 4578-8. Plantas individuales de la línea 6636 se enumeran más de una vez dado que estas plantas se utilizaron como masculinas en diferentes (aunque relacionadas) líneas femeninas susceptibles.

5 Ninguna de las plantas de la línea 4578 dio como resultado una F₁ completamente resistente. Sin embargo, autofertilizando la línea 4578 (véase la línea 6636) fue posible descubrir líneas que transferían el gen de resistencia para el 100%. En 4 de 10 casos, esto dio como resultado una F₁ completamente resistente. La segregación de la F₁ derivada de la planta no. 6636-4 muestra un patrón que es diferente de las otras líneas. Tal como se muestra en la
 10 Tabla 4, existe variación en el número de plantas resistentes en las poblaciones F₁ segregantes (2R/3S - 3R/2S). Se espera que la segregación sea más fiable cuando el número de plantas resistentes y susceptibles en poblaciones F₁ segregantes se combina. Dado que se utiliza la misma fuente de resistencia en todas las poblaciones F₁, la causa de la resistencia no estable (segregante) es la misma. La Tabla 8 muestra los resultados compilados de cada uno de los tres cruzamientos mencionados en la Tabla 4 (4578, 6636 cruzamiento 1 y 6636 cruzamiento 2; los dos cruzamientos de 6636 son el resultado de dos progenitores susceptibles diferentes que están siendo cruzados con plantas
 15 resistentes idénticas.

Tabla 4: Segregación de F₁ de Sylvia, derivada de plantas individuales.

No. de planta de progenitor resistente	No. de plantas de la F ₁ resistentes	No. de plantas de la F ₁ susceptibles
4578-1	1	4
4578-2	31	19
4578-3	20	30
4578-4	24	26
4578-5	30	20
4578-7	24	26
4578-8	27	23
4578-9	31	19
4578-10	26	24
6636-1	50	0
6636-2	19	21
6636-4	50	0
6636-5	31	19
6636-6	26	24
6636-6	27	23
6636-8	24	26
6636-9	33	0
6636-10	50	0
6636-1	50	0
6636-2	29	21
6636-3	40	0
6636-5	34	16
6636-6	27	23
6636-7	24	26
6636-8	33	17
6636-9	50	0
6636-10	50	0
6636-1	50	0
6636-2	31	19

No. de planta de progenitor resistente	No. de plantas de la F1 resistentes	No. de plantas de la F1 susceptibles
6636-3	50	0

La autofertilización de plantas individuales de la línea 6636, utilizadas para producir las poblaciones F₁ en la Tabla 4, también se ensayaron para resistencia a PMMoV. Todas las líneas autofertilizadas mostraban resistencia completa. Los resultados se enumeran en la tabla 5.

5

Tabla 5: resultados de autofertilizaciones de líneas parentales

No. de planta de progenitor resistente	No. de plantas resistentes	No. de plantas susceptibles
6636-1	50	0
6636-2	50	0
6636-3	50	0
6636-4	50	0
6636-5	50	0
6636-6	50	0
6636-7	50	0
6636-8	50	0
6636-9	50	0
6636-10	50	0

A partir de este experimento, la característica no deseada del alelo L4 se vuelve clara, dado que puede concluirse que la autofertilización de plantas individuales que da como resultado una descendencia no segregante confirma la homocigosis, mientras que el cruzamiento de plantas resistentes individuales con plantas susceptibles da como resultado una descendencia F₁ segregante y confirma la heterocigosis.

10

Ejemplo 3. Desarrollo de variedad Manito no segregante.

Se siguió una estrategia similar a la descrita en el Ejemplo 2 para desarrollar una línea Manito no segregante. Las plantas de la línea parental resistente se cruzaron individualmente con plantas del progenitor susceptible y se evaluó la segregación en las poblaciones F₁ individuales. Los resultados se enumeran en la Tabla 6. Todas las plantas que mostraban baja fertilidad (fenotipo SNFD) se eliminaron antes del cruzamiento, estas plantas se enumeran en la Tabla 6 como "no ensayadas". Inicialmente no se observó baja fertilidad en la planta no. 0025-5 sino que apareció más tarde para estar presente.

15

20

Tabla 6: F₁ segregación de Manito, derivada de plantas individuales (primer cribado)

No. de planta del progenitor resistente	No. de plantas de la F1 resistentes	No. de plantas de la F1 susceptibles	No. de planta del progenitor resistente	No. de plantas de la F1 resistentes	No. de plantas de la F1 susceptibles
0021-1	39	11	0023-11	35	15
0021-2	34	16	0023-12	no ensayado	no ensayado
0021-3	34	16	0024-1	37	13
0021-4	39	11	0024-2	42	8
0021-5	no ensayado	no ensayado	0024-3	38	12
0021-6	38	12	0024-4	41	9
0021-7	22	28	0024-5	39	11
0021-8	no ensayado	no ensayado	0024-6	38	12
0021-9	30	20	0024-7	no ensayado	no ensayado
0021-10	34	16	0024-8	44	6
0022-1	no ensayado	no ensayado	0024-9	38	12
0022-2	40	10	0024-10	40	10
0022-3	42	8	0024-11	27	13
0022-4	39	11	0025-1	30	20
0022-5	40	10	0025-2	35	15
0022-6	31	19	0025-3	34	16
0022-7	39	11	0025-4	32	18
0022-8	40	10	0025-5	50	0
0022-9	35	15	0025-6	34	16
0022-10	35	15	0025-7	37	13
0023-1	41	9	0025-8	no ensayado	no ensayado
0023-2	no ensayado	no ensayado	0025-9	36	14

ES 2 864 573 T3

0023-3	no ensayado	no ensayado		0025-10	no ensayado	no ensayado
0023-4	38	12		0025-11	no ensayado	no ensayado
0023-5	36	14		0026-1	30	20
0023-6	40	10		0026-2	31	19
0023-7	no ensayado	no ensayado		0026-3	36	14
0023-8	no ensayado	no ensayado		0026-4	34	16
0023-9	39	11		0026-5	no ensayado	no ensayado
0023-10	39	11		0026-6	no ensayado	no ensayado

Solamente la planta 0025-5 dio como resultado un híbrido no segregante. Un total de 14 de 60 líneas estaban marcadas para baja fertilidad (fenotipo SNFD). La segregación de la población F₁ en esta tabla también se compila en la Tabla 8.

5 Para aumentar el número de plantas resistentes, que dan como resultado una F₁ no segregante, se realizó un segundo ensayo. Las plantas, marcadas para baja fertilidad no se eliminaron antes del cruzamiento. Los resultados se enumeran en la Tabla 7, la segregación también se compila en Tabla 8. Un total de 12 de 50 líneas (25%) dieron como resultado una población F₁ completamente resistente.

10 Tabla 7: segregación de F₁ de Manito, derivada de plantas individuales (segundo cribado)

No. de planta del progenitor resistente	No. de plantas de la F1 resistentes	No. de plantas de la F1 susceptibles
2825-1	32	18
2825-2	31	19
2826-3	35	15
2827-2	30	20
2827-3	29	21
2827-4	24	26
2828-2	29	21
2828-3	33	17
2829-1	28	22
2829-3	28	22
2829-4	40	10
2829-5	33	17
2831-4	35	15
2832-1	34	16
2832-2	34	16
2832-3	33	17
2833-1	14	36
2833-2	32	18
2833-4	50	0
2833-5	37	13
2825-4	50	0
2826-1	31	19
2826-2	26	24
2826-4	50	0
2826-5	50	0
2827-1	27	23
2827-5	50	0

ES 2 864 573 T3

No. de planta del progenitor resistente	No. de plantas de la F1 resistentes	No. de plantas de la F1 susceptibles
2828-1	25	25
2828-4	29	21
2829-2	17	33
2830-3	11	39
2830-4	22	28
2831-1	24	26
2831-2	19	31
2831-3	28	22
2832-4	29	21
2833-3	50	0
2833-6	50	0
2834-1	24	27
2834-3	23	27
2834-4	20	30
2834-5	50	0
2834-6	48	2
2825-3	50	0
2830-1	20	0
2830-2	50	0
2830-5	20	30
2831-5	50	0
2832-5	24	26
2834-2	31	19

Tabla 8: Resultados compilados de F₁ segregantes en los Ejemplos 2 y 3

Ejemplo	No. de planta del progenitor resistente	Nombre	No. de plantas resistentes	No. de plantas susceptibles
2	4578	progenitor masculino de Sylvia	214	191
2	6636, cruzamiento 1	progenitor masculino de Sylvia	127	113
2	6636, cruzamiento 2	progenitor masculino de Sylvia	147	103
3	0021-0026	progenitor masculino de Manito	1602	608
3	2825-2834	progenitor masculino de Manito	1069	832

5 Es similar en todos los casos en que existen más plantas resistentes que susceptibles. La segregación con 4578 y 6636-cruzamiento 1 se acerca a 1:1, encajando en un modelo de gen único en el que el progenitor resistente es heterocigótico. En 6636-cruzamiento 2 y 2825-2834 la segregación es más cercana a 9:7. Una segregación de 9:7 se deriva de una población F₂. Cruzando dos líneas homocigóticas (las líneas no segregan para resistencia) no es posible obtener una segregación de 9:7 en la F₁. Es más probable que también aquí esté presente una segregación 1:1. La segregación de 0021-0026 difiere de las otras encajando mejor en una segregación 3:1. Probablemente, esta
10 diferencia es causada por el hecho de que las plantas se seleccionaron en base a fertilidad y las plantas poco fértiles se eliminaron antes de que se realizaran los cruzamientos.

Ejemplo 4. Arrastre por ligamiento como explicación para la herencia no Mendeliana observada del alelo L4.

Introducción

De las plantas utilizadas para los cruzamientos en la tabla 8, se valoraron la fertilidad y el crecimiento enano (fenotipo SNFD). Todas las plantas que dieron como resultado una F_1 no segregante mostraban baja fertilidad. Esto indica ligamiento de baja fertilidad y no segregación. Los resultados mostrados en la Tabla 7 mostraban que aproximadamente el 25% de las plantas daban como resultado un híbrido no segregante. En la Tabla 6, el 25% de las plantas estaban marcadas como poco fértiles y se eliminaron antes de la evaluación de la F_1 . Cuando las plantas poco fértiles se consideran progenitores que transfieren una buena resistencia, entonces los resultados entre la tabla 6 y la tabla 7 son comparables. En referencia a líneas consanguíneas en el presente documento derivadas de estas plantas no segregantes mostraban de hecho crecimiento enano. A partir de esto puede concluirse que los rasgos negativos (resistencia no estable, baja fertilidad, crecimiento reducido) están estrechamente ligados o son pleiotrópicos al alelo L4.

Se formularon y ensayaron posibles explicaciones de las observaciones en el Ejemplo 1-3 sobre la naturaleza de la segregación en F_1 . La posibilidad de que un gen letal estuviera ligado al alelo susceptible o que un gen letal estuviera ligado al alelo resistente se ensayaron, pero se rechazaron. Las posibilidades de silenciamiento génica, el requisito de un segundo gen para la expresión del alelo L4 o el requisito de un segundo gen para la transferencia del alelo L4, también fueron rechazadas. Además, no se descubrió ninguna evidencia de la presencia de transposones o impronta (los genes son silenciados debido a condiciones específicas durante el desarrollo de las semillas). Además, la posibilidad de que el rasgo de resistencia fuera no monogénico se descartó después de esquemas de ensayo elaborados. Posteriormente se ensayó si el segmento de introgresión de *C. chacoense* daría como resultado problemas con el plegamiento cromosómico del cromosoma de *C. annuum*. Un plegamiento irregular daría como resultado un cromosoma desequilibrado, causando problemas en la meiosis de las plantas homocigóticas (L4L4). Durante el emparejamiento de los cromosomas, uno de los cromosomas podría resultar entonces dañado, dando como resultado un alelo defectuoso, llamado alelo "-". Éste, a su vez, daría como resultado la pérdida de resistencia. Teniendo en cuenta que en F_1 segregantes no se descubrieron marcadores en plantas susceptibles, la rotura del cromosoma es lo más probable. Si la presencia homocigótica del alelo defectuoso es letal, la autofertilización del genotipo L4 daría como resultado, de hecho, una línea resistente completa en un bioanálisis. Además, una F_1 no segregante puede derivarse de esta manera y cuando un genotipo L4 se cruza con una línea susceptible, la F_1 segregará en una relación de 1:1. Las plantas con genotipo L4 homocigótico (L4L4) pueden encontrarse después de la autofertilización de un genotipo L4, sin embargo se predijo que estas plantas encontrarían problemas en la meiosis. Esto explicaría entonces por qué una línea es completamente resistente (es decir todas las plantas ensayadas son resistentes) cuando se ensayan en un bioanálisis y se sigue descubriendo que da como resultado una población F_1 segregante cuando se cruzaba con un progenitor susceptible. Esto también explicaría por qué no se descubrieron marcadores en las plantas de la población F_1 que eran susceptibles.

Esta explicación predice que el genotipo L4L4 que da como resultado una F_1 no segregante, es el resultado de una reorganización del plegamiento del cromosoma. En esta situación de plegamiento reorganizada, el emparejamiento de cromosomas no daría como resultado la rotura de un brazo del cromosoma. Sin embargo, lo más probable es que otros procesos dentro de la planta sean alterados, dando como resultado una baja fertilidad y crecimiento reducido (plantas enanas). Se sabe que solamente una cantidad limitada de polen se deriva de estas plantas. Además, una baja cantidad de semillas se derivan supuestamente de dichas líneas.

A partir de los experimentos anteriores se concluyó, por lo tanto, que el fragmento del genoma de *C. chacoense* que comprende el alelo L4 es demasiado grande y causa poblaciones F_1 segregantes. Por lo tanto, la reducción del tamaño de este segmento podría resolver el problema.

Diseño experimental

La presencia de diversos marcadores del locus L4 se evaluó en una serie de líneas de pimiento. En primer lugar, dos líneas de *C. annuum* resistentes, M-873 y M-3751 se evaluaron para el tamaño del segmento de introgresión. Se sabía que estas líneas dan como resultado F_1 no segregante y fertilidad anormal. El tamaño del segmento se comparó con la introgresión presente en líneas consanguíneas de S&G (Padre de Manito) cribando para marcadores que flanquean el alelo L4. Para la posición de los marcadores, véase la figura 2. Los resultados se enumeran en la Tabla 9.

Las líneas se ensayan en 4 marcadores ligados al locus L4, la posición de los marcadores hacia el alelo L4 se muestra en la tabla 1. Los marcadores, enumerados en la Tabla 9, se valoran como homocigótico presente, heterocigótico presente o ausente. También se enumera la fertilidad de la línea parental resistente y resistencia de la F_1 . La evaluación de la fertilidad se realizó visualmente, valorando la cantidad de polen en "cantidad limitada de polen" (-; mala fertilidad), "cantidad intermedia de polen" (+/-; fertilidad media), y "cantidad de polen similar a una planta de control fértil no resistente" (+; buena fertilidad).

La resistencia en las líneas M-873 y M-3751 se originaba a partir de líneas de reproducción de pimiento de semillas De Ruiter, Bergschenhoek, Países Bajos. Todas las demás fuentes compartían una línea consanguínea S&G como donadora de L4. De las líneas M-873 y M-3751 se cribaron plantas con fertilidad buena y media para la presencia o ausencia de marcadores. La fertilidad media era, en todos los casos, mejor que la fertilidad en el Padre de líneas

Manito. Otras líneas fueron líneas de reproducción que se seleccionaron en base a la fertilidad o debido a que dieron como resultado híbridos no segregantes.

Tabla 9: Evaluación de introgresiones de *C. chacoense* en varias líneas de pimiento

Nº	Nº de planta	Fertilidad	F1	Generación	Marcador L4			
					E39/M58-F-95	E58/M60-F-255	E58/M50-F-580	E39/M58-F-
M-873	1	+	Resistente	F8	+	++	+	-
	2	+	Resistente	F8	+	++	+	-
	3	+	Resistente	F8	+	++	+	-
	4	±	Resistente	F8	+	++	+	-
	5	±	Resistente	F8	+	++	+	-
	6	±	Resistente	F8	+	++	+	-
M-3751	1	+	Resistente	F4	+	++	+	-
	2	+	Resistente	F4	+	++	+	-
	3	+	Resistente	F4	+	++	+	-
	4	±	Resistente	F4	+	++	+	-
	5	±	Resistente	F4	+	++	+	-
	6	±	Resistente	F4	+	++	+	-
8972	1	+	?	F5	+/-	+	+/-	+/-
	2	+	?	F5	+/-	+	+/-	+/-
	3	+	?	F5	+/-	+	+/-	+/-
	4	+	?	F5	+/-	+	+/-	+/-
8600	9	-/±	Resistente	F11	++	++	+	++
8602	3	-/±	Resistente	F11	++	++	+	++
	5	-/±	Resistente	F11	++	++	+	++
8603	7	-/±	Resistente	F11	++	++	+	++
8607	7	-/±	Resistente	F11	++	++	+	++
8609	2	-/±	?	F11	+	+	+/-	+/-
8613	2	-/±	?	F11	+	+	+/-	+/-
Madre de Manito	1	-	Resistente	F11	++	++	+	++

5 ++: marcador homocigótico presente, resistente; -: marcador homocigótico ausente, susceptible; +/-: marcador heterocigótico presente, resistente; +: marcador presente, diferencias alélicas no ensayadas; ?, no ensayado

10 Los resultados indican que, en las líneas M-873 y M-3751, está presente un segmento de introgresión más pequeño. El marcador del Grupo 2 (E39/M58-F-65) está ausente. Evaluando el árbol genealógico de estas líneas, ambas compartían vp-nr 91Pa0424, F3T13 7310 en común.

Plantas de las líneas 8972, 8609 y 8613 dieron el valor heterocigótico, esto a pesar de un valor de resistente completo en el bioanálisis. Con la línea 8972 se realizaron cruzamientos. Los resultados se enumeran en la tabla 10.

15 Tabla 10: Resultados de poblaciones F₁ derivadas de la línea 8972 de valoración heterocigótica de la Tabla 9.

F ₁ con nº de campo 8972		
Nº de planta	No. de plantas resistentes	No. de plantas susceptibles
99Pa1256	12	18
99Pa1270	30	0
99Pa1280	13	14
99Pa1285	18	16
99Pa1289	10	14

20 Los resultados de la población F₁ obtenidos de la línea 8972 eran según lo esperado. Para identificar recombinantes adicionales, se analizaron líneas segregantes para la presencia de marcadores del locus L4. Se seleccionaron líneas, en base a la segregación de la F₃, que era la más cercana a 3:1. Las plantas de cada población F₃ se reunieron, dado que la recombinación debe haberse producido durante la autofertilización de F₁ a F₂. En caso de que hubiera tenido lugar una recombinación, la población F₃ debe ser homocigótica para la recombinación. Las líneas seleccionadas se enumeran en la tabla 11.

Tabla 11: Líneas seccionadas para identificación de recombinantes

Población	Nº de línea	Segregación	
		No. de plantas resistentes	No. de plantas ensayadas
1	6552	25	35
2	6557	27	35
3	6559	32	35
4	6561	29	35
5	6565	26	35
6	6566	25	35
7	6567	26	35
8	6568	26	35
9	6571	35	44
10	6572	32	44
11	6585	29	44

5 Los resultados del análisis del marcador para estas plantas se enumeran en la tabla 12. Los marcadores del locus L4 se indican tal como se muestra en la Tabla 1. El valor del marcador "+" indica presencia del marcador, el valor del marcador "-" indica ausencia.

Tabla 12: Valor del marcador de líneas seleccionadas resistentes L4 y sin fenotipo SNFD

Marcador	Grupo 1 (específico del alelo L4)			Grupo 1/3		Grupo 3	Grupo 2	
	E58/M50-F-580	E39/M58-F-95	E58/M60-F-255	E66/M49-F-387	E74/M61-F-385	E60/M54-F-447	E39/M58-F-65	E39/M51-F-380
No. de planta								
001	+	+	+	+	+	-	-	-
002	+	+	+	+	+	+	-	-
003	+	+	+	+	+	+	-	-
004	+	+	+	+	+	+	-	-
005	+	+	+	+	+	+	-	-
006	+	+	+	+	+	+	-	-
007	+	+	+	+	+	+	-	-
008	+	+	+	+	+	+	-	-
009	+	+	+	+	+	+	-	-
010	+	+	+	+	+	-	-	-
011	+	+	+	+	+	-	-	-

10 Puede concluirse que no se descubrieron nuevos recombinantes dentro de estas líneas seleccionadas que contenían los marcadores para el alelo de resistencia L4 (marcadores del Grupo 1), pero que no contenían material genético que comprendía la ubicación de los marcadores del Grupo 2. Se descubrió que estas líneas eran resistentes, mientras que el fenotipo SNFD no se observó. Se concluyó, por lo tanto, que las recombinaciones que condujeron a la pérdida del material genético que comprendía la ubicación de los marcadores del Grupo 2, o del Grupo 2 y el Grupo 3 dio como resultado la pérdida del fenotipo SNFD.

15 Referencias

- Alonso E, Garcia-Luque I, de la Cruz A, Wicke B, Avila-Rincon MJ, Serra MT, Castresana C, Diaz-Ruiz JR (1991) Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *J Gen Virol.* 72: 2875-84.
- 20 Antignus Y, Lachman O, Pearlsman M (2000) A New Strain of Pepper Mild Mottle Virus (PMMV) Overcoming Resistance Conferred by L4 Alleles, *Phytoparasitica* 28(3): 282-283.
- Avila-Rincon MJ, Ferrero ML, Alonso E, Garcia-Luque I, Diaz-Ruiz JR (1989) Nucleotide sequences of 5' and 3' non-coding regions of pepper mild mottle virus strain S RNA. *J Gen Virol.* 70: 3025-31.
- 25 Ben-Chaim A, Grube RC, Lapidot M, Jahn M, Paran I (2001) Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. *Theoretical and Applied Genetics* 102(8): 1213-1220.
- Berzal-Herranz A, de la Cruz A, Tenllado F, Diaz-Ruiz JR, Lopez L, Sanz AI, Vaquero C, Serra MT, Garcia-Luque I (1995) The capsicum L3 gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology*, 209: 498-505.
- 30 Boukema IW, Jansens K, Hofman K (1980) Strains of TMV and genes for resistance in *Capsicum* Synopsis of the 4th meeting of the Eucarpia *Capsicum* Working Group, p. 44-48.

- Boukema IW (1982) Resistance to a new strain of TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. *Capsicum Newsletter* 1: 49-51.
- Boukema IW (1983) Research on the location of the gene for resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. and male sterility in progenies from the cross *C. chacoense* x *C. annum* L. *Proceedings Vth Meeting Capsicum and Eggplant Working Group of Eucarpia*, 4-7 de julio, Plovdiv, Bulgaria p. 84-87.
- 5 Boukema IW (1984) Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by an allele of the L-locus. *Capsicum Newsletter* 3: 47- 48.
- Briggs FN, Knowles PF (1967) *Introduction to Plant Breeding*. Reinhold Publishing Corporation. Estados Unidos
- Christou P, Murphy JE, y Swain WF (1987) Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 84: 3962-3966.
- 10 Dallwitz MJ (1980) A general system for coding taxonomic descriptions. *Taxon* 29: 41-46
- Dallwitz MJ, Paine TA, Zurcher EJ (1993) *User's Guide to the DELTA System: a general system for processing taxonomic descriptions*. 4ª edición. 136 págs. (CSIRO Division of Entomology: Canberra)
- Deshayes A, Herrera-Estrella L, Caboche M (1985) Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. *EMBO J.* 4: 2731-2737.
- 15 D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992) *Plant. Cell* 4: 1495-1505.
- Dodds JH y Roberts LW (1995) *Experiments in Plant Tissue Culture*. 3ª Ed. Cambridge University Press.
- Draper J, Davey MR, Freeman JP, Cocking EC y Cox BJ (1982) Ti plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid-transformed *Petunia* protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* 23, 451-458.
- García-Luque I, Ferrero ML, Rodríguez JM, Alonso E, de la Cruz A, Sanz AI, Vaquero C, Serra MT, Díaz-Ruiz JR (1993) The nucleotide sequence of the coat protein genes and 3' non-coding regions of two resistance-breaking tobamoviruses in pepper shows that they are different viruses. *Arch Virol.* 131(1-2): 75-88.
- 20 Gilardi P, García-Luque I, Serra MT (2004) The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both L2 and L4 gene-mediated resistance in *Capsicum*. *J Gen Virol.* 85: 2077-85.
- Gleba IU, Sytnik KM, Shoeman R (1984) *Protoplast Fusion, Genetic Engineering in Higher Plants*. Berlin; Nueva York: Springer-Verlag, 1984.
- 25 Gruber MY, Crosby WL (1993) *Vectors for Plant Transformation*. In: Glick BR and Thompson JE (Eds.) *Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*, CRC Press, págs. 89-119.
- Hagiwara K, Ichiki TU, Ogawa Y, Omura T, Tsuda S (2002) A single amino acid substitution in 126-kDa protein of Pepper mild mottle virus associates with symptom attenuation in pepper; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain, C-1421. *Arch Virol.* 147(4): 833-40.
- 30 Hain R, Stabel P, Czernilofsky AP, Steinbliss HH, Herrera-Estrella L, Schell J (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene to plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 199: 161-168.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholts D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- 35 Kado CI (1991) Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 1-32.
- Kirita M, Akutsu K, Watanabe Y, Tsuda S (1997) Nucleotide sequence of the Japanese isolate of pepper [*Capsicum annum*] mild mottle tobamovirus (TMV-P) RNA. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 373-376.
- Klein TM, Gradziel T, Fromm ME, Sanford JC (1988). Factors influencing gene delivery into *zea mays* cells by high velocity microprojectiles. *Biotechnology* 6: 559-563.
- 40 Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, y Fitzpatrick- McElligott S (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology* 10: 286-291.
- Koop H-U and Spangenberg G (1989) Electric field induced fusion and cell reconstitution with preselected single protoplasts and subprotoplasts of higher plants. In Neumann, E., Sowers, A. and Wolford, S. (eds), *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. Plenum Publishers, Nueva York, págs. 355-366.
- 45 Laursen CM, Krzyzek RA, Flick CE, Anderson PC, Spencer TM (1994) Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. *Plant Mol Biol.* 24(1): 51-61.
- Lefebvre V, Pflieger S, Thabuis A, Caranta C, Blattes A, Chauvet JC, Daubeze AM, Palloix A (2002) Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome* 45(5): 839-54.
- 50 Lefebvre V, Chevre AM (1995) Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. *Agronomie* 15: 3-19.
- Lim PO, Ryu JS, Lee HJ, Lee U, Park YS, Kwak JM, Choi JK, Nam HG (1997) Resistance to tobamoviruses in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of pepper mild mottle virus (Korean isolate). *Mol Cells.* 7(3): 313-9.
- 55 Miki BL, Fobert PF, Charest PJ, Iyer VN (1993) Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants. In: Glick BR and Thompson JE (Eds.) *Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*, CRC Press, págs. 67-88.
- Moloney MM, Walker JM, Sharma KK (1989) High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports* 8: 238-242.
- McKinney HH (1952) Two strains of tobacco mosaic virus, one of which is seed borne in an etch-immune pungent pepper. *Plant Dis. Rep.*, 36: 184-187.
- 60 Michelmore RW (1995) Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15: 393-427.
- Phillips RL, Somers DA, Hibberd KA (1988) Cell/tissue culture and in vitro manipulation. In: G.F. Sprague & J.W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, 3ª ed., p. 345-387. Madison, WI, Estados Unidos, American Society of Agronomy.
- 65 Rast ATB (1988) Pepper tobamoviruses and pathotypes used in resistance breeding *Capsicum Newsletter*, 7: 20-23.

- Rieger R, Michaelis A, Green MM (1968) *A Glossary of Genetics and Cytogenetics*. Springer-Verlag, N. Y.
- Rodriguez-Cerezo E, Moya A, Garcia-Arenal F (1989) Variability and evolution of the plant RNA virus pepper mild mottle virus. *J Virol.* 63(5): 2198-203.
- 5 Ruiz del Pino M, Moreno A, Garcia de Lacoba M, Castillo-Lluva S, Gilardi P, Serra MT, Garcia-Luque I (2003) Biological and molecular characterization of P101 isolate, a tobamoviral pepper strain from Bulgaria. *Arch Virol.* 148(11): 2115-35.
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Particulate Sci. Technol.* 5: 27-37.
- Sanford JC (1988) The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6: 299-302.
- Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation. *Physiologica Plantarum*, 79, 206-209.
- 10 Sanford JC, Smith FD, and Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology* 217: 483-509.
- Sundberg E and Glimelius K (1986) A method for production of interspecific hybrids within Brassicaceae via somatic hybridisation, using resynthesis of Brassica napus as a model. *Plant science* 43: 158-162.
- Tenllado F, Garcia-Luque I, Serra MT, Diaz-Ruiz JR (1996) Resistance to pepper mild mottle tobamovirus conferred by the 54-kDa gene sequence in transgenic plants does not require expression on the wild-type 54-kDa protein. *Virology.* 219(1): 330-5.
- 15 Tenllado F, Garcia-Luque I, Serra MT, Diaz-Ruiz JR (1997) Pepper resistance-breaking tobamoviruses: can they co-exist in single pepper plants?. *Europ. J. Plant Pathol.* v. 103(3): 235-243.
- Tobias I, Rast ATB, Maat DZ (1982) Tobamoviruses of pepper, eggplant, and tobacco: comparative host reactions and serological relationships. *Neth. J. Plant Pathol.* 88: 257-268.
- 20 Tsuda S, Kirita M, Watanabe Y (1998) Characterization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of overcoming the L3 gene-mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. *Mol Plant Microbe Interact.* 11(4): 327-331.
- Velasco L, Janssen D, Ruiz-Garcia L, Segundo E, Cuadrado IM (2002) The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a pepper mild mottle virus (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance in pepper. *J Virol Methods.* 106(1): 135-40.
- 25 Van Duin PJW (1998) Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant, Avignon, France.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
- 30 Werner R, Olschewski J, Mergenhagen D (2001) Identification and cloning of amplified fragment length polymorphism markers linked to the mating type locus of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J. Phycol* 37(3): 427
- Wetter C, Conti M, Altschuh D, Tabillion R, van Regenmortel MHV (1984) Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily, *Phytopathology* 74: 405-410.
- 35 Winter P, Kahl G (1995) Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 438-448.
- Zhang L, Cheng L, Xu N, Zhao M, Li C, Yuan J, y Jia S (1991) Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. *Biotechnology* 9: 996-997.

REIVINDICACIONES

1. Marcador seleccionado del grupo que consiste en E58/M50-F-580, E39/M58-F-95, E58/M60-F-255 y E54/M55-F-101 como se indica en la Figura 3.
- 5 2. Marcador seleccionado del grupo que consiste en E35/M49-F-90, E39/M58-F-65, E39/M51-F-380, E58/M62-F-168, E66/M54-F-600 y Tm3 DRS como se muestra en la Figura 3.
- 10 3. Marcador seleccionado del grupo que consiste en E60-M54-F-447, E63/M61-F-501, E66/M43-F-387, E66/M49-F-387, E66/M61-F-99, E67/M50-F-150, E67/M62-F-214, E70/M54-F-133, E71/M47-F-550, y E74/M61-F-385 como se indica en la Figura 3.
- 15 4. Par de cebadores seleccionado del grupo que consiste en 5'-GACTGCGTACCAATTCGGT-3' (E58) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3' (M50), 5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3' (E39) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACGT-3' (M58), 5'-GACTGCGTACCAATTCGGT-3' (E58) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3' (M60), 5'-GACTGCGTACCAATTCCT-3' (E54) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACGA-3' (M55), 5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3' (E35) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3' (M49), 5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3' (E39) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACGT-3' (M58), 5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3' (E39) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCA-3' (M51), 5'-GACTGCGTACCAATTCGGT-3' (E58) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3' (M62), 5'-GACTGCGTACCAATTCGAT-3' (E66) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3' (M54), 5'-AATCCTTCAACTGCCATTC-3' (P118) / 5'-ATTGGGACATGAGGTGTGTA-3' (P119), 5'-GACTGCGTACCAATTCCTC-3' (E60) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3' (M54), 5'-GACTGCGTACCAATTCGAA-3' (E63) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCTG-3' (M61), 5'-GACTGCGTACCAATTCGAT-3' (E66) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3' (M62), 5'-GACTGCGTACCAATTCGAT-3' (E66) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3' (M49), 5'-GACTGCGTACCAATTCGAT-3' (E66) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCTG-3' (M61), 5'-GACTGCGTACCAATTCGCA-3' (E67) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3' (M50), 5'-GACTGCGTACCAATTCGCA-3' (E67) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3' (M62), 5'-GACTGCGTACCAATTCGCT-3' (E70) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3' (M54), 5'-GACTGCGTACCAATTCGGA-3' (E71) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3' (M47), y 5'-GACTGCGTACCAATTCGGT-3' (E74) / 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCTG-3' (M61).
- 20 25 30
5. Un procedimiento para seleccionar una planta del género *Capsicum* para resistencia al patotipo 1.2.3 del *virus del moteado atenuado del pimiento* (PMMoV), comprendiendo el procedimiento las etapas de cribado del genoma de una planta del género *Capsicum* utilizando un par de cebadores según la reivindicación 4 y/o un marcador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 35

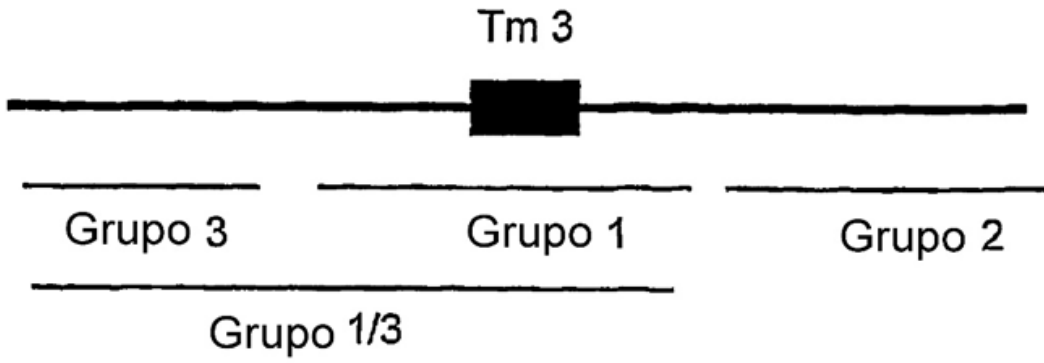


Fig. 1

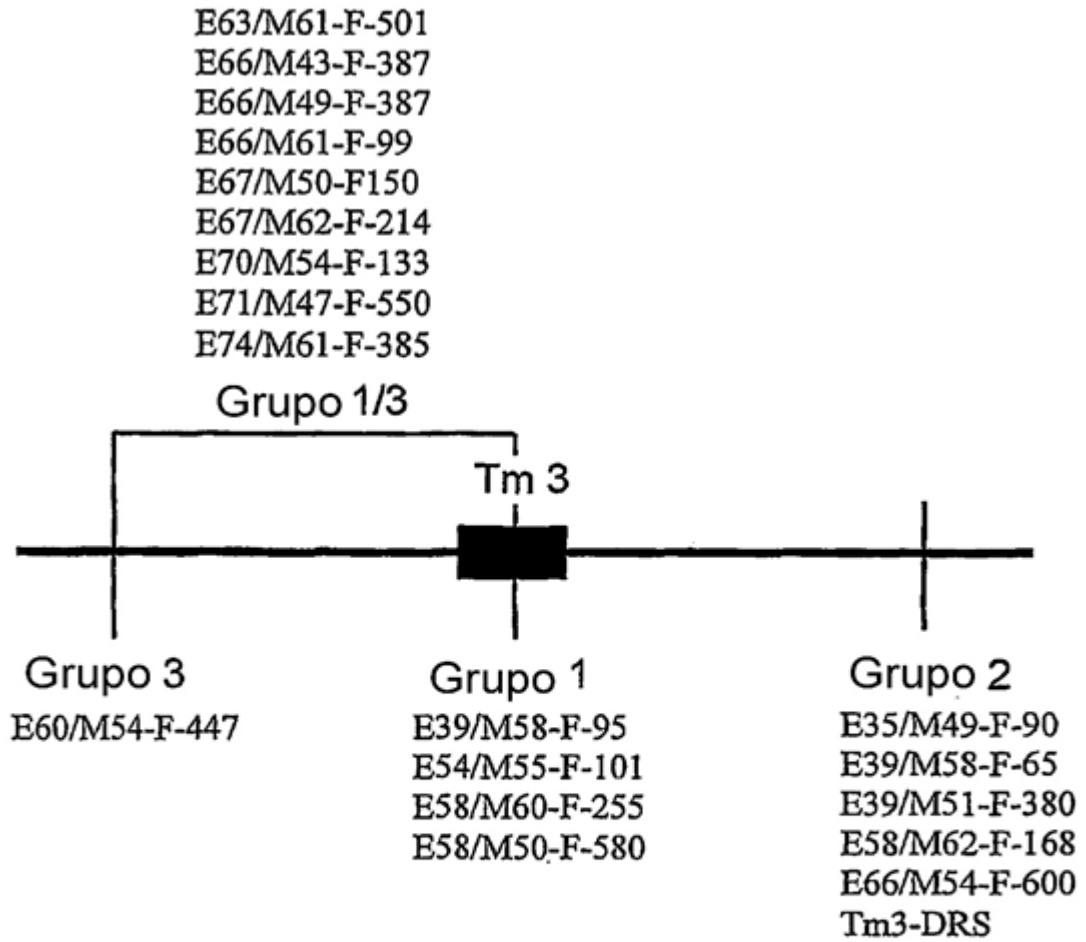


Fig. 2

Grupo 1	Secuencia del 1° cebador (5'-3')	Secuencia del 2° cebador (5'-3')	Longitud del marcador (pb)
E39/M58-F-95	GACTGCGTACCAATTCCAGA	GATGAGTCCTGAGTAAACCGT	95
E54/M55-F-101	GACTGCGTACCAATTCCCT	GATGAGTCCTGAGTAAACGA	101
E58/M60-F-255	GACTGCGTACCAATTCCGT	GATGAGTCCTGAGTAACTC	255
E58/M50-F-580	GACTGCGTACCAATTCCGT	GATGAGTCCTGAGTAAACAT	580
Grupo 2	Secuencia del 1° cebador (5'-3')	Secuencia del 2° cebador (5'-3')	Longitud del marcador (pb)
E35/M49-F-90	GACTGCGTACCAATTCCACA	GATGAGTCCTGAGTAAACAG	90
E39/M58-F-65	GACTGCGTACCAATTCCAGA	GATGAGTCCTGAGTAAACGT	65
E39/M51-F-380	GACTGCGTACCAATTCCAGA	GATGAGTCCTGAGTAAACCA	380
E58/M62-F-168	GACTGCGTACCAATTCCGT	GATGAGTCCTGAGTAACTT	168
E66/M54-F-600	GACTGCGTACCAATTCCGAT	GATGAGTCCTGAGTAAACCT	600
Tm3-DRS	AATCCTTCAACTGCCATTTTC	ATTGGGACATGAGGTGTGTA	350
Grupo 3	Secuencia del 1° cebador (5'-3')	Secuencia del 2° cebador (5'-3')	Longitud del marcador (pb)
E60/M54-F-447	GACTGCGTACCAATTCCCTC	GATGAGTCCTGAGTAAACCT	447
Grupo 1/3	Secuencia del 1° cebador (5'-3')	Secuencia del 2° cebador (5'-3')	Longitud del marcador (pb)
E63/M61-F-501	GACTGCGTACCAATTCCGAA	GATGAGTCCTGAGTAAACTG	501
E66/M43-F-387	GACTGCGTACCAATTCCGAT	GATGAGTCCTGAGTAAATA	387
E66/M49-F-387	GACTGCGTACCAATTCCGAT	GATGAGTCCTGAGTAAACAG	387
E66/M61-F-99	GACTGCGTACCAATTCCGAT	GATGAGTCCTGAGTAAACTG	99
E67/M50-F-150	GACTGCGTACCAATTCCGCA	GATGAGTCCTGAGTAAACAT	150
E67/M62-F-214	GACTGCGTACCAATTCCGCA	GATGAGTCCTGAGTAAACTT	214
E70/M54-F-133	GACTGCGTACCAATTCCGCT	GATGAGTCCTGAGTAAACCT	133
E71/M47-F-550	GACTGCGTACCAATTCCGGA	GATGAGTCCTGAGTAAACAA	550
E74/M61-F-385	GACTGCGTACCAATTCCGGT	GATGAGTCCTGAGTAAACTG	385

Fig. 3