

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 472**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013** **PCT/EP2013/077828**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014** **WO14096415**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013** **E 13819037 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 2934096**

54 Título: **Plantas de *Brassica* resistentes a la hernia de la col**

30 Prioridad:

21.12.2012 EP 12199140

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

14.11.2024

73 Titular/es:

RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.
(100.0%)

Burgemeester Crezeelaan 40
2678 KX De Lier, NL

72 Inventor/es:

VAN DEN NIEUWENHUIZEN, ADRIANUS
JOHANNES MARIA;

NOVOSELOV, EVGENY y

DETAVERNIER, MATHIEU PIERRE BERTRAND

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 987 472 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas de *Brassica* resistentes a la hernia de la col

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a plantas de *Brassica oleracea* resistentes a la hernia de la col. La invención se refiere además a partes de estas plantas, a semillas y a otro material de propagación, y a la progenie de estas plantas.

10 **Antecedentes de la invención**

Brassica es un género de plantas, que se incluyen taxonómicamente dentro de la familia *Brassicaceae*. Contiene muchos cultivos importantes económicos que sirven como fuente de alimentos, pero también se emplean especies en la producción de aceite. En general, el género *Brassica* incluye *B. napus*, *B. nigra*, *B. rapa*, *B. juncea* y *B. oleracea*. *Brassica napus* es muy importante en la producción de aceite vegetal que se aplica cada vez más en la industria del combustible. Juntos con *Brassica rapa*, *Brassica nigra* y *Brassica juncea*, *Brassica oleracea* es una especie que desempeña un papel muy importante en la producción de alimentos humanos. Con el tiempo, se originaron cultivares dentro de *B. oleracea*, entre los que se encuentran la col, la col china, la coliflor, la berza, el brócoli, el colinabo y las coles de Bruselas.

La col salvaje se ha criado en una amplia gama de diferentes variedades cultivadas hortícolas que permanecieron sexualmente compatibles. Sin embargo, su aspecto no muestra un nivel muy alto de similitud filogenética. El amplio intervalo en diferencias de características morfológicas dentro de *Brassica oleracea* tiene mucho interés y forma la base de una singularidad de los cultivos. Estos incluyen una inflorescencia ampliada (coliflor, brócoli); un tallo ampliado (colinabo); un brote apical ampliado (col); brotes laterales agrandados (col de Bruselas).

El cultivo de variedades de verduras crucíferas como *Brassica oleracea* tiene como objetivo la producción de variedades comerciales óptimamente adaptadas a condiciones de crecimiento local que permitan al cultivador maximizar la productividad de plantas de alta calidad. Durante la selección es necesario tener en cuenta muchas características que se relacionan tanto con los rasgos de entrada como con los de salida. Uno de los rasgos de entrada más importantes en este sentido se refiere a la resistencia a enfermedades, en particular a la resistencia a microorganismos.

Plantas de col se ven afectadas por una amplia gama de plagas y enfermedades. Estas amenazas son, por lo tanto, objetos de alta prioridad para los cultivadores de col, para obtener cultivos que sean vigorosos y altamente resistentes. En ausencia de resistencias en estos cultivos, los productores necesariamente tienen que aplicar estrategias agronómicas como la rotación de cultivos y cultivos intercalados para reducir el daño de las plagas en las áreas donde se cultivan hortalizas crucíferas.

La presente invención se refiere a las especies dentro de *Brassica oleracea* que se ven afectadas por la infección con la hernia de la col.

La hernia de la col es una enfermedad común, probablemente la más dañina, que se encuentra entre las coles, rábanos, nabos y otras plantas pertenecientes a la familia *Cruciferae*. Es causada por el organismo unicelular eucariota *Plasmodiophora brassicae* Wor. Se estima que la incidencia de la hernia de la col en el noroeste de Europa, Japón, América del Norte y Australia afecta alrededor del 10 % de los cultivos de *B. oleracea*. Las esporas diseminadas permanecen infecciosas durante 15 años. Mediante la adición de calcio y otros medios para evitar una caída del pH del suelo, se puede reducir la presión de la enfermedad. Se considera que el tratamiento químico es ineficaz debido a las regulaciones ambientales o estos productos químicos son demasiado caros.

El ciclo de vida del parásito consiste en dos fases principales. La primera fase tiene lugar cerca de los pelos radiculares. Después de la germinación de la espora en reposo, la zoospora primaria se adhiere a un pelo radicular. Por la presión de turgencia del quiste de esporas, se inyecta una pequeña ameba sin paredes en el citoplasma del huésped y se forma un plasmodio primario multinucleado. A través de mecanismos de fagocitosis, los plasmodios migran más profundamente al tejido radicular y alcanzan la corteza radicular. En esta segunda fase se desarrollará el plasmodio secundario multinuclear y se desencadena la formación de agallas mediante divisiones celulares e hipertrofia. Finalmente, las células huésped contendrán esporas haploides resistentes que pueden diseminarse.

Las agrupaciones que se forman en las raíces inhiben el transporte de nutrientes y agua, lo que provoca una inhibición del crecimiento de las plantas y un aumento de la susceptibilidad al marchitamiento. La infección por *Plasmodiophora brassicae* se produce en todo el mundo y tiene una amplia gama de huéspedes. Las prácticas de cultivo y/o los tratamientos químicos no han tenido éxito en proteger los cultivos o han demostrado ser demasiado caros. Por lo tanto, el desarrollo de cultivares resistentes ahora se considera el método más económico y eficiente para el control de la hernia de la col.

Sin embargo, existen múltiples aislados de *Plasmodiophora brassicae*. Esto hace que el mejoramiento de diferentes cultivares de *Brassica oleracea* sea complejo, ya que diferentes cultivares están infectados por diferentes aislados de *P. brassicae*. También, poblaciones de campo de *P. brassicae* exhiben claras diferencias en patogenicidad. Estas

poblaciones pueden clasificarse con respecto a patogenicidad diferencial. Se utilizan comúnmente las series diferenciales clasificadas por Williams (1966) y el conjunto Diferencial Europeo para la Hernia de la Col (ECD) de Buczacki.

Varias fuentes genéticas de resistencia ya se han descrito en la bibliografía. Estos comprenden tipos monogénicos, así como poligénicos y recesivos, así como dominantes. En general, las resistencias dominantes monogénicas se identifican en *B. rapa* y *B. napus*. En *B. oleracea*, en general solo se han encontrado fuentes de recesión poligénica. Estas resistencias no mostraron que eran suficientemente resistentes a las razas de hernia de la col y en segundo lugar, se ha demostrado muy difícil transferir la resistencia entre líneas comerciales de *B. oleracea*. La transferencia de una resistencia de *B. rapa* a *B. oleracea* también se ha demostrado que es difícil, ya que la compatibilidad sexual de estas especies de Brassica son bajas.

En la técnica anterior se han identificado resistencias a *Plasmodiophora brassicae*. Sin embargo, varios argumentos son relevantes cuando se consideran la presente invención a la luz de la técnica anterior. En primer lugar, es importante que la resistencia contra *Plasmodiophora brassicae* sea lo más amplia posible. Una resistencia más amplia proporcionará una protección más prolongada, especialmente en vista del carácter virulento y persistente del patógeno que causa la hernia de la col.

En segundo lugar, el trasfondo genético de la resistencia es de mucha importancia en dos sentidos. Por un lado, es una ventaja cuando la base genética se limita a un pequeño número de genes, preferentemente un gen. Esto permite una fácil transferencia del o de los determinantes genéticos que confieren resistencia a otras plantas de Brassica. Por otro lado, con respecto a las relaciones genéticas complejas que se encuentran dentro del género Brassica, también es una ventaja si los determinantes genéticos que confieren la resistencia se derivan de la misma especie de Brassica, por ejemplo *Brassica oleracea*.

Resumiendo, existe la necesidad de una resistencia fiable hacia múltiples cepas de hernia de la col que también sea fácil de transferir a cultivos de Brassica, en particular, cultivos de *Brassica oleracea*. El objeto de la presente invención es mejorar las plantas de Brassica, en particular las plantas de *Brassica oleracea* con respecto a la resistencia a múltiples cepas de *Plasmodiophora brassicae* (hernia de la col) en donde el determinante genético que confiere dicha resistencia es fácil de transferir entre variedades de Brassica, en particular entre variedades de *Brassica oleracea*.

En la investigación que conduce a la presente invención, se desarrollaron nuevas plantas de Brassica, en particular plantas de *Brassica oleracea*, que muestran una resistencia a la hernia de la col. Se encontró que estas nuevas plantas muestran un patrón de resistencia alterado a la hernia de la col.

La presente invención proporciona así una planta de Brassica, en particular una planta de *Brassica oleracea* que porta un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, cuyo determinante genético confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, y como está presente en y es obtenible a partir de plantas que se cultivan a partir de semillas que se depositaron con el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41851, en donde dicho determinante genético como está presente en las plantas que se cultivan a partir de las semillas del depósito NCIMB 41851 comprende:

- QTL1, ubicado en el cromosoma 3 entre el marcador BO00365 (SEQ ID NO:3) y marcador BO00403 (SEQ ID NO:4) y unido al marcador BO00812 (SEQ ID NO:1); o

- QTL1, ubicado en el cromosoma 3, entre el marcador BO01881 (SEQ ID No:9) y el marcador BO02440 (SEQ ID No:10) y unido al marcador BO02081 (SEQ ID No:7); o

- QTL1, ubicado en el cromosoma 3, entre el marcador BO02157 (SEQ ID No:14) y el marcador BO02306 (SEQ ID No:15) y unido al marcador BO02480 (SEQ ID No:13); y/o

- QTL2, ubicado en el cromosoma 8 entre el marcador BO00829 (SEQ ID N° 5) y el marcador BO1007 (SEQ ID N° 6) y unido al marcador BO01026 (SEQ ID N° 2); y/o

- QTL3, ubicado en el cromosoma 4 entre el marcador BO02418 (SEQ ID No:11) y BO01995, (SEQ ID No:12) y unido al marcador BO02117 (SEQ ID No:8).

La combinación de dos, preferiblemente, tres QTL que confieren resistencia conduce a un mayor nivel de resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en particular a un conjunto de aislados de *P. brassicae*.

Una planta de *Brassica oleracea* de la invención comprende un determinante genético que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en donde dicho determinante genético se caracteriza por la presencia de al menos:

- QTL1, que en el depósito NCIMB 41851 está unido al marcador molecular caracterizado por la SEQ ID No:1, SEQ ID No:3 y SEQ ID No:4; y/o

- QTL2, que en el depósito NCIMB 41851 está unido al marcador molecular caracterizado por la SEQ ID No. 2, SEQ ID No:5 y SEQ ID No. 6

- QTL3, que en el depósito NCIMB 41851 está unido al marcador molecular caracterizado por la SEQ ID No:8, SEQ ID No:11 y SEQ ID No:12

Alternativamente, QTL1, está en el depósito NCIMB 41851 unido a marcadores moleculares caracterizados por la SEQ ID No:7, SEQ ID No:9 y SEQ ID No:10.

Alternativamente, QTL1, está en el depósito NCIMB 41851 unido a marcadores moleculares caracterizados por la SEQ ID No:13, SEQ ID No:14 y SEQ ID No:15.

La invención se refiere en particular a plantas de *Brassica*, en particular a plantas de *Brassica oleracea*, que portan un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, cuyo determinante genético confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en particular a la cepa *Plasmodiophora brassicae* denominada 16/3/30 de acuerdo con el conjunto diferencial ECD (Buczacki y col., Trans Br. Mycol. Soc. 65, 295-303, (1975)).

En una realización preferida, la invención se refiere en particular a plantas de *Brassica*, en particular a plantas de *Brassica oleracea*, que portan un determinante genético que comprende QTL1 y QTL3, cuyo determinante genético confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en particular a la cepa *Plasmodiophora brassicae* denominada 16/3/30 de acuerdo con el conjunto diferencial ECD (Buczacki y colo., Trans Br. Mycol. Soc. 65, 295-303, (1975)).

En otra realización, la invención se refiere a plantas de *Brassica*, en particular a plantas de *Brassica oleracea* que portan un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, cuyo determinante genético confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en particular a la cepa *Plasmodiophora brassicae* denominada 31/31/31 según el conjunto diferencial ECD (Buczacki y col., Trans Br. Mycol. Soc. 65, 295-303, (1975)).

En una realización preferida, la invención se refiere a plantas de *Brassica*, en particular a plantas de *Brassica oleracea* que portan un determinante genético que comprende QTL1 y QTL2, cuyo determinante genético confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en particular a la cepa *Plasmodiophora brassicae* denominada 31/31/31 según el conjunto diferencial ECD (Buczacki y col., Trans Br. Mycol. Soc. 65, 295-303, (1975)). En una realización adicional, la invención se refiere a plantas de *Brassica*, en particular a plantas de *Brassica oleracea* que portan un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, cuyo determinante genético confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en particular a las cepas de *Plasmodiophora brassicae* denominadas 16/2/30, 31/31/12 y 16/14/29 de acuerdo con el conjunto diferencial ECD (Buczacki y col., Trans Br. Mycol. Soc. 65, 295-303, (1975)).

En una realización preferida, la invención se refiere a plantas de *Brassica*, en particular a plantas de *Brassica oleracea* que portan un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, cuyo determinante genético confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en particular a las cepas de *Plasmodiophora brassicae* denominadas 16/3/30 y 31/31/31 de acuerdo con el conjunto diferencial ECD (Buczacki y col., Trans Br. Mycol. Soc. 65, 295-303, (1975)).

Una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* puede comprender el determinante genético de heterocigosidad, cuyo determinante genético se puede obtener de plantas cultivadas a partir de semillas de las cuales se deposita una muestra representativa con el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41851.

En una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* que comprende el determinante genético que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, dicho determinante genético puede obtenerse mediante introgresión de una planta cultivada a partir de semilla que se depositó en NCIMB, con el número de acceso NCIMB 41851.

En una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* que comprende el determinante genético que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, dicha resistencia se puede introgresar a partir de una planta cultivada a partir de semilla que se depositó en NCIMB, con el número de acceso NCIMB 41851.

Para el cultivador experto que desea introgresar un rasgo en una planta, es suficiente conocer el fenotipo y tener una fuente del rasgo y para tener opcionalmente marcadores para seguir el rasgo en el mejoramiento. En la presente invención, el experto tiene una fuente del rasgo en forma de depósito y sabe en qué fenotipo buscar, concretamente, la resistencia a la hernia de la col. Además, puede disponer de marcadores para seguir más fácilmente la herencia del rasgo.

Más en particular, cabe señalar que si el criterio o criterios de selección están claramente definidos, el experto podrá identificar los descendientes que portan el rasgo en cualquier generación posterior. Para el rasgo de la invención los descendientes de un cruce entre una planta que no porta el determinante genético que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae* y una planta que porta el determinante genético que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de las cuales se depositaron semillas representativas con el número de acceso NCIMB 41851 que portan ese rasgo se pueden encontrar en crecimiento de plantas F2 a partir de semillas que son el resultado de la etapa inicial y de autofecundación, y seleccionar plantas que son resistentes a la hernia de la col.

Una planta de *Brassica* de la invención, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que comprende un determinante genético que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, puede obtenerse mediante:

- a) el cultivo de plantas de semillas del depósito, depositadas con el número de acceso NCIMB 41851;
- b) el cultivo de plantas en un entorno infestado por *Plasmodiophora brassicae*;
- 5 c) la selección de plantas que muestran resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, por no formar agrupaciones,
- d) el cruzamiento de una planta seleccionada en la etapa c con una planta no resistente a *Plasmodiophora brassicae* para obtener una población F1;
- 10 e) autofecundación de plantas de la población F1 para obtener una población F2; y
- f) repetición de las etapas b) y c) para identificar plantas que muestran resistencia a la hernia de la col.

Alternativamente, la etapa de selección como se describe en la etapa c) se realiza mediante el genotipado de las plantas mediante el uso de los marcadores de SNP moleculares que se describen en esta solicitud. Como resultado, también la selección como se repite en la etapa f) se puede realizar haciendo uso de dichos marcadores moleculares.

En ausencia de marcadores moleculares, o en el caso de que se haya producido una recombinación entre el determinante genético y el marcador de modo que el marcador ya no sea predictivo, la equivalencia de los determinantes genéticos puede determinarse mediante la conocida prueba de alélismo, más específicamente denominada como prueba de complementación. Para realizar una prueba de alélismo, una planta de muestra que es homocigótica en relación con el determinante conocido de la invención se cruza con el material que someter a prueba que también es homocigótico en relación con su determinante genético. Cuando no hay segregación en la F2 del cruce para el rasgo que se va a observar, se ha demostrado que los determinantes genéticos son equivalentes o iguales.

Cuando más de un gen puede ser responsable de un determinado rasgo y se realiza una prueba de alélismo para determinar la equivalencia, el experto que hace la prueba tiene que asegurarse de que todos los genes relevantes estén presentes homocigóticamente para que la prueba funcione correctamente.

La planta probadora es adecuadamente una planta del depósito NCIMB 41851, o una planta progenie del depósito que muestra resistencia a la hernia de la col.

La planta de Brassica de la invención es preferentemente una *planta de Brassica oleracea*, pero también puede ser cualquier otra planta del género Brassica en el que la persona experta pueda introgresar el determinante genético de la invención, por ejemplo, las siguientes especies de Brassica: *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Brassica campestris*, *Brassica cretica*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea* y *Brassica nigra*. El experto sabe cómo realizar cruces interespecíficos con estas especies, p.ej., mediante rescate de embriones, fusión de protoplastos y otras tecnologías relacionadas.

La invención se refiere a plantas de *Brassica oleracea* de las siguientes variantes:

- var. acephala DC. (coles rizadas)
- var. botrytis L. (coliflor, romanesco)
- var. capitata L. (col roja, blanca, col de Milán)
- var. gemmifera DC. (col de Bruselas)
- 45 var. gongylodes L. (colinabo)
- var. italica Plenck. (brócoli, calabresa)
- var. sabauda L. (col de Milán)
- var. sabellica (berza)
- var. selensia (col crespá)
- 50 var. albiflora Sun [= B. alboglabra] (col rizada china)
- var. alboglabra [= B. alboglabra] (col rizada china)
- var. chinensis Prain (sarsón de Burma)
- var. fimbriata Mill. (col rizada de cocina)
- var. fruticosa Metz. (col rizada de mil cabezas)
- 55 var. tronchuda L. H. Bailey (col tronchuda)
- var. costata (col portuguesa)
- var. medullosa (col de meollo)
- var. pamifolia (col rizada, col risada de Jersey)
- var. ramona (col rizada de mil cabezas)

Se prefieren las variedades brócoli, coliflor, romanesco, col roja, col blanca, col de Milán y colinabo

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la invención se refiere a semillas de las plantas de *Brassica*, en particular plantas de *Brassica oleracea*, que comprenden el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* como se encuentra en la semilla con el número de registro de depósito NCIMB 41851.

La invención también se refiere a semillas de la planta de *Brassica*, en particular la planta de *Brassica oleracea* de la invención que es capaz de crecer hasta convertirse en una planta de *Brassica oleracea* de la invención. La semilla puede ser una semilla híbrida. Un método para producir semillas híbridas puede comprender cruzar una primera planta parental con una segunda planta parental y cosechar la semilla híbrida resultante. En caso de que el rasgo sea recesivo, ambos padres deben ser homocigotos para el rasgo de resistencia para que la semilla híbrida porte el rasgo de la invención. No tienen que ser necesariamente uniformes para otros rasgos. Ambos progenitores portan así el determinante genético que causa la resistencia a *Plasmodiophora brassicae* en forma homocigótica.

Está claro que una planta padre de *Brassica*, en particular una planta progenitora de *Brassica oleracea* que proporciona el determinante genético de la invención no es necesariamente una planta cultivada directamente de las semillas depositadas. El progenitor también puede ser una planta de progenie de la semilla o una planta de progenie de semillas que se identifica que tiene o ha adquirido el determinante genético que causa el rasgo de la invención por otros medios.

La invención también se refiere a la progenie de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* de la invención, cuya progenie es resistente a *Plasmodiophora brassicae*. Esta descendencia puede producirse por reproducción sexual o vegetativa de una planta de la invención o una planta de su descendencia. La progenie porta el determinante genético que causa el rasgo de resistencia a *Plasmodiophora brassicae* y que es como se encuentra en la semilla con el número de registro de depósito NCIMB 41851, ya sea en forma homocigótica o heterocigótica.

Cuando el determinante genético de la invención está presente homocigóticamente, la planta progenie muestra el rasgo de resistencia en la misma o de manera similar a la planta cultivada a partir de una semilla de la que se depositó una muestra representativa con el número de acceso NCIMB 41851. Esto significa que dicha progenie tiene las mismas características de resistencia a *Plasmodiophora brassicae* según se reivindican para la planta de *Brassica*, en particular las plantas de *Brassica oleracea* de la invención. Además de esto, la planta puede modificarse en una o más características. Estas modificaciones adicionales se logran, por ejemplo, por mutagénesis o mediante transformación con un transgén.

Tal como se utiliza en el presente documento, la palabra “progenie” pretende significar la descendencia o el primer y todos los descendientes posteriores de un cruce con una planta de la invención que muestra el rasgo de resistencia y/o porta el determinante genético subyacente al rasgo. La progenie de la invención comprende descendientes de cualquier cruce con una planta de la invención que porta el determinante genético que causa el rasgo de resistencia. Dicha progenie se puede obtener por ejemplo cruzando una primera planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* con una segunda planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, en donde una de las plantas se cultivó a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa bajo el número de acceso NCIMB 41851, pero también puede ser la progenie de cualquier otra planta de *Brassica*, en particular cualquier otra planta de *Brassica oleracea*, que porta el determinante genético como está presente en NCIMB 41851.

Dichas plantas de progenie comprenden un determinante genético que comprende uno o más QTL que causan la resistencia de la invención, en donde dicho determinante genético puede obtenerse de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* cultivada a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa con el número de acceso NCIMB 41851. Por lo tanto, el rasgo de resistencia tiene una base genética en el genoma de una planta de *Brassica oleracea* y, por ejemplo, utilizando el bioensayo descrito en el Ejemplo 1, las plantas de *Brassica oleracea* pueden identificarse como plantas de la invención.

La invención se refiere además a partes de una planta de *Brassica oleracea* de la invención, que son adecuadas para la reproducción sexual y vegetativa, es decir, el material de propagación, en donde dicho material de propagación comprende el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de la invención. Estas partes se seleccionan, por ejemplo, del grupo que consiste en microsporas, polen, ovarios, óvulos, sacos embrionarios y ovocitos.

Además, la invención se refiere a partes de la planta de *Brassica oleracea* de la invención que son adecuadas para la reproducción vegetativa, en particular esquejes, raíces, tallos, células, protoplastos y cultivos de tejidos de la planta de *Brassica oleracea* de la invención. El cultivo de tejidos comprende células regenerables. Dicho cultivo de tejidos puede derivarse de hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocotilos, células meristemáticas, puntas de raíces, anteras, flores, semillas y tallos. El material de propagación lleva el determinante genético que causa la resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de la invención, ya sea en forma homocigótica o heterocigótica.

La invención se refiere además a una planta de *Brassica oleracea* cultivada o regenerada a partir de dicho material de propagación de una planta de la invención, cuya planta de *Brassica oleracea* es resistente a *Plasmodiophora brassicae*. El fenotipo de resistencia es como se encuentra en las plantas cultivadas a partir de semillas que tienen el número de acceso NCIMB 41851 y el determinante genético subyacente a la resistencia es como está presente en dichas semillas.

La invención se refiere además a una célula de una planta de *Brassica oleracea* de la invención, célula que comprende un determinante genético que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en donde dicho determinante es como está presente en una planta de *Brassica oleracea* cultivada a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa con el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41851. Dicha célula comprende así la información genética que codifica dicha resistencia, en particular información genética que es sustancialmente idéntica, preferiblemente completamente idéntica a la información genética que codifica dicho rasgo de resistencia de la planta de *Brassica*

oleracea cultivada a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa bajo el NCIMB. número de acceso 41851, más en particular el determinante genético descrito en el presente documento. Preferiblemente, la célula de la invención es una parte de una planta o de una parte de planta, pero la célula también puede estar en forma aislada.

En una realización, la invención se refiere a plantas de *Brassica oleracea* que comprenden el determinante genético que causa el rasgo de la invención y que han adquirido dicho determinante genético mediante la introducción de la información genética que es responsable del rasgo de una fuente adecuada, ya sea mediante reproducción convencional, o modificación genética, en particular mediante cisgénesis o transgénesis. La cisgénesis es la modificación genética de plantas con un gen natural, que codifica un rasgo (agrícola), de la propia planta de cultivo o de una planta donante compatible sexualmente. La transgénesis es la modificación genética de una planta con un gen de una especie no cruzada o un gen sintético.

En una realización, la fuente de la que se adquiere la información genética, en particular el determinante genético, está formada por una planta cultivada a partir de las semillas depositadas, o por descendientes sexuales o vegetativos de las mismas.

La invención también se refiere a partes cosechadas de plantas de *Brassica oleracea* de la invención o partes de las mismas, a productos alimenticios que comprenden partes cosechadas de plantas de *Brassica oleracea* de la invención o partes de las mismas, ya sea en forma natural u opcionalmente procesada.

La parte o producto alimenticio cosechado puede ser o comprende una cabeza de col, una binza, un tallo, una hoja, una raíz, un brote, una semilla o cualquier otra parte de una planta de *Brassica*, en donde la parte porta el determinante genético. La parte cosechada también se puede usar para la producción de biocombustible. El producto alimenticio o la parte cosechada pueden haber experimentado una o más etapas de procesamiento. Tal etapa de procesamiento podría comprender, pero no se limita a, cualquiera de los siguientes tratamientos o combinaciones de los mismos: corte, lavado, cocción, vaporización, horneado, fritura, pasteurización, congelación, trituración, extracción de aceite, decapado o fermentación. La forma procesada que se obtiene también es parte de esta invención.

También se describe en la presente una molécula de ácido nucleico que es causante de la resistencia a la resistencia a *Plasmodiophora brassicae*. Dicha molécula de ADN comprende una secuencia de ADN, en particular que comprende QTL1, que se coloca en el cromosoma 3 entre marcadores BO00365 (SEQ ID NO: 3) y BO00403 (SEQ ID NO: 4), más en particular enlazado al marcador BO00812 (SEQ ID NO: 1), o una parte que confiere resistencia de la misma.

Alternativamente, dicha secuencia de ADN se coloca en el cromosoma 3 entre el marcador BO01881 (SEQ ID No:9) y el marcador BO02440 (SEQ ID No:10), más en particular vinculado al marcador BO02081 (SEQ ID No:7).

Alternativamente, dicha secuencia de ADN se coloca en el cromosoma 3 entre el marcador BO02157 (SEQ ID No:14) y el marcador BO02306 (SEQ ID No:15), más en particular unido al marcador BO02480 (SEQ ID No:13).

Una molécula de ácido nucleico que es causal de resistencia a *Plasmodiophora brassicae* puede comprender una secuencia de ADN, que en particular comprende QTL2, que se coloca en el cromosoma 8 entre los marcadores BO00829 (SEQ ID NO: 5) y BO01007 (SEQ ID NO: 6), más en particular vinculado al marcador BO01026 (SEQ ID NO: 2), o una parte que confiere resistencia de la misma.

Una molécula de ácido nucleico que es causal de resistencia a *Plasmodiophora brassicae* puede comprender una secuencia de ADN, en particular que comprende QTL3, que se coloca en el cromosoma 4 entre los marcadores BO02418 (SEQ ID No:11) y BO01995 (SEQ ID No:12), más en particular unido al marcador BO02117 (SEQ ID No:8), o una parte que confiere resistencia del mismo.

Enlazado al marcador se pretende que signifique que hay un evento de recombinación entre dicho marcador y el QTL es menor que la posibilidad de que haya un evento de recombinación entre el QTL y cualquier otro marcador. Preferentemente, esto pretende significar que dicho marcador está genéticamente más cercano a dicho QTL.

La invención también se refiere al uso de los marcadores designados como SEQ ID No:1, SEQ ID No:2, SEQ ID No:3, SEQ ID No:4, SEQ ID No:5, SEQ ID No:6, SEQ ID No:7, SEQ ID No:8, SEQ ID No:9, SEQ ID No:10, SEQ ID No:11, SEQ ID No:12, SEQ ID No:12, SEQ ID No:13, SEQ ID No:14 y SEQ ID No:15 para identificar plantas de *Brassica oleracea* que son resistentes a *Plasmodiophora brassicae*.

En una realización adicional, la invención también se refiere al uso de los marcadores designados como SEQ ID No:1, SEQ ID No:2, SEQ ID No:3, SEQ ID No:4, SEQ ID No:5, SEQ ID No:6, SEQ ID No:7, SEQ ID No:8, SEQ ID No:9, SEQ ID No:10, SEQ ID No:11, SEQ ID No:12, SEQ ID No:12, SEQ ID No:13, SEQ ID No:14 y SEQ ID No:15 para desarrollar otros marcadores unidos a QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3.

También se describe en la presente memoria el germoplasma de plantas de la invención. El germoplasma está constituido por todas las características hereditarias de un organismo y abarca al menos el rasgo de resistencia de la invención. El germoplasma se puede usar en un programa de mejoramiento para el desarrollo de plantas de *Brassica oleracea* que son resistentes a *Plasmodiophora brassicae*.

Una planta de *Brassica oleracea* de la invención puede usarse en el mejoramiento para conferir resistencia contra la *Plasmodiophora brassicae*.

5 Un método para la producción de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que comprende un determinante genético que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae* y es como se encuentra en la semilla con el número de acceso de depósito NCIMB 41851, puede comprender

- 10 a) cruzar una planta que comprende el determinante genético que conduce a dicho rasgo con otra planta;
- b) autofecundar la F1 resultante para obtener plantas F2;
- c) seleccionar plantas que tienen dicho rasgo en la F2;
- 15 d) opcionalmente realizar una o más rondas adicionales de autopolinización o cruce, y posteriormente seleccionar una planta que comprenda el rasgo.

La palabra “rasgo”, en el contexto de esta solicitud, se refiere al fenotipo de la planta. La expresión “determinante genético” se usa para la información genética en el genoma de la planta que provoca el rasgo de la invención. Por tanto, el determinante genético comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3. El término “QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3” como se usa en esta solicitud comprende en particular QTL1 o QTL2 o QTL3 o QTL1 y QTL2 o QTL1 y QTL3 o QTL2 y QTL3 o QTL1 y QTL2 y QTL3, más en particular QTL1 y QTL2 o QTL1 y QTL3. Cuando una planta muestra el rasgo de la invención, su genoma comprende el determinante genético que causa el rasgo de la invención, en particular el determinante genético que se encuentra en la semilla con el número de acceso al depósito NCIMB 41851 y conduce a la resistencia a la hernia de la col como se define en la presente descripción. Por lo tanto, la planta tiene el determinante genético de la invención. El determinante genético está preferiblemente presente en estado homocigoto, pero también puede estar presente en estado heterocigoto. QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3 también están preferiblemente presentes en estado homocigoto, pero cada uno puede por separado o en cualquier combinación también estar presente en estado heterocigoto

30 Está claro que el progenitor que proporciona el rasgo de la invención no es necesariamente una planta cultivada directamente a partir de las semillas depositadas. El progenitor también puede ser una planta descendiente de la semilla o una planta descendiente de semillas que se identifica que tienen el rasgo de la invención por otros medios.

35 También se describe en la presente memoria un método para la producción de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* que comprende un determinante genético que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, que comprende

- a) cruzar una planta que comprende el determinante genético que conduce a dicho rasgo con otra planta;
- 40 b) retrocruzar opcionalmente la F1 resultante con el progenitor preferido;
- c) seleccionar plantas que tengan el rasgo en la F2;
- d) opcionalmente realizar una o más rondas adicionales de autopolinización o cruce, y posteriormente seleccionar una planta que comprenda el rasgo.
- 45

Además, otro rasgo deseado puede introducirse en una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* que comprende un determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae*. Dicho método puede comprender:

- 50 a) cruzar una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* que comprende un determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, una semilla representativa de la cual se depositó bajo el número de depósito NCIMB 41851, con una segunda planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* que comprende un rasgo deseado para producir progenie F1
- 55 b) seleccionar una progenie F1 que comprende el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* y el rasgo deseado, preferiblemente por medio de marcadores moleculares;
- c) autofecundar la progenie F1 y seleccionar una progenie F2 que comprende el determinante genético que causa la resistencia a *Plasmodiophora brassicae* y el rasgo deseado;
- 60 c) cruzar la descendencia F2 seleccionada con cualquier progenitor, para producir descendencia de retrocruce;
- e) seleccionar la progenie retrocruzada que comprende el rasgo deseado y un determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae*; y
- 65

f) opcionalmente repetir las etapas c) y d) una o más veces en sucesión para producir una cuarta progenie de retrocruzamiento seleccionada o superior que comprenda el rasgo deseado y un determinante genético que cause resistencia a *Plasmodiophora brassicae*. La invención incluye la planta de *Brassica*, en particular la planta de *Brassica oleracea* producida por este método.

La etapa de selección como se describe en la etapa c) se realiza adecuadamente mediante el genotipado de las plantas mediante el uso de los marcadores de SNP moleculares que se describen en esta solicitud. Como resultado, también las etapas de selección que se repiten en la etapa f) se pueden realizar haciendo uso de dichos marcadores moleculares.

La selección de plantas que comprende un determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* se hace por ejemplo en el F1 usando marcador BO00812 y marcador BO01026 (SEQ ID No:1 y SEQ ID No:2, respectivamente). En otro aspecto, la selección del rasgo de la invención se inicia en la F2 de un cruce o, de forma alternativa, de un retrocruzamiento. La selección de plantas en la F2 puede hacerse fenotípicamente, así como usando el dicho marcador o marcadores que detectan directa o indirectamente el determinante genético subyacente al rasgo.

En una realización adicional, selección para plantas que comprenden un determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* se inicia en la F3 o una generación posterior.

La planta que comprende el determinante genético es preferiblemente una planta híbrida pero también puede ser una planta de una línea endogámica, una haploide doble o una población segregante.

Un método para la producción de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que comprende el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de la invención puede comprender el uso de una técnica de generación haploide duplicada para generar una línea haploide duplicada que comprende dicho rasgo.

También se divulga en el presente documento una semilla híbrida que puede cultivarse hasta convertirse en una planta que comprende el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de la invención y un método para producir dicha semilla híbrida que comprende cruzar una primera planta parental con una segunda planta parental y cosechar la resultante. semilla híbrida, en la que dicha primera planta parental y/o dicha segunda planta parental es la planta según se reivindica.

Un método para producir una planta híbrida de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* que comprende el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de la invención, puede comprender cruzar una primera planta parental de *Brassica*, en particular una planta parental de *Brassica oleracea* con una segunda planta parental de *Brassica*, en particular una planta genitora de *Brassica oleracea* y cosechar la semilla híbrida resultante, en la que la primera planta madre y/o la segunda planta madre comprenden el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de la invención, y cultivar dichas semillas híbridas en plantas híbridas que comprenden un determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae*.

Un método adicional para la producción de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* que comprende el determinante genético de la invención que causa resistencia a la *Plasmodiophora brassicae* puede comprender el uso de una semilla que comprende el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* para hacer crecer dicha planta *Brassic*, en particular dicha planta *Brassica oleracea*. Las semillas son, adecuadamente, semillas cuya muestra representativa se depositó en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41851.

Un método para la producción de semillas puede comprender el cultivo de plantas de *Brassica*, en particular plantas de *Brassica oleracea* a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41851, permitiendo que las plantas produzcan semillas y cosechando esas semillas. La producción de las semillas se realiza adecuadamente mediante cruce o autopolinización.

Un método para la producción de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que comprende un determinante genético que causa resistencia a la *Plasmodiophora brassicae* puede comprender el uso de cultivo de tejidos.

Un método para la producción de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que comprende el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de la invención también puede comprender el uso de reproducción vegetativa.

También se describe en la presente memoria un método para la producción de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que comprende un determinante genético que causa resistencia a la *Plasmodiophora brassicae* mediante el uso de un método para la modificación genética para introgresar dicho rasgo en la planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*. La modificación genética comprende modificación transgénica o transgénesis, usando un gen de una especie que no se puede cruzar o un gen sintético, y modificación cisgénica o cisgénesis, usando un gen natural, que codifica un rasgo (agrícola), de la propia planta de cultivo o de una planta donadora de sexualmente compatible.

Un método de mejoramiento para el desarrollo de *plantas de Brassica*, en particular *plantas de Brassica oleracea* que comprenden el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de la invención puede comprender el uso de germoplasma que comprende dicho rasgo. La semilla representativa de dicha planta que comprende el determinante genético y es representativa del germoplasma tiene el número de depósito NCIMB 41851.

En un método para la producción de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* que comprende el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de la invención puede usar la progenie o material de propagación de una planta que comprende el determinante genético que confiere dicho rasgo como una fuente para introgresar dicho rasgo en otra planta de *Brassica*, en particular otra planta *Brassica oleracea*. La semilla representativa de dicha planta que comprende el determinante genético se depositó con el número de depósito NCIMB 41851.

Una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, de la invención, que comprende el determinante genético que causa resistencia a *Plasmodiophora brassicae* de la invención, se puede obtener mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento y/o familiares para el experto.

La invención se refiere a una célula de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, planta que porta el determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3 como se describe en el presente documento, que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, como está presente en una planta *Brassica*, en particular una planta de *Brassica* planta cultivada a partir del número de registro de depósito de semillas 41851.

La invención se refiere además a una célula de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que porta un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, como está presente en una planta *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* cultivada a partir de semillas como se deposita con NCIMB en el 27 de junio de 2011 y que tiene el número de acceso 41851. Dicha *planta de Brassica*, en particular *la planta de Brassica oleracea* se puede obtener cruzando una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* con una segunda planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* cultivada a partir de semillas como se deposita con NCIMB en el 27 de junio de 2011 y que tiene el número de acceso 41851, y seleccionar una *planta de Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* que muestra una resistencia al patógeno en una prueba de enfermedad, preferiblemente una prueba de marcador como está presente en la planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* de la invención que porta un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*.

Las semillas con el número de acceso de NCIMB 41851 se pueden usar para transferir el determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2, que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en otra planta de *Brassica*, en particular *una planta de Brassica oleracea*.

Una *planta de Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que porta un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, como está presente y obtenible de una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, cultivada a partir de semilla con NCIMB número 41851, puede usarse como cultivo.

Una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que porta un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, como está presente en una planta de *Brassica*, en particular *la planta de Brassica oleracea* cultivada a partir de semillas con número de acceso 41851, puede usarse como fuente de semilla.

Una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que porta un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, como está presente en una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* cultivada a partir de semilla con el número de acceso NCIMB 41851, puede usarse como fuente de material de propagación.

Una planta de *Brassica oleracea*, que porta un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, como está presente en una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea* cultivada a partir de semilla con el número de acceso NCIMB 41851, puede usarse para el consumo.

Una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que porta un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2, que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, como está presente en las semillas con el número de acceso de NCIMB 41851, puede usarse para conferir un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, que confiere resistencia a *Plasmodiophora brassicae*, en una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*.

Una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, puede usarse como receptor de alelos de resistencia como está presente en las semillas con el número de acceso de NCIMB 41851.

Definiciones

“Introgresión” como se usa en esta solicitud pretende indicar la introducción de un rasgo en una planta que no lleva el rasgo por medio de cruce y selección.

“Progenie”, tal como se utiliza en esta solicitud, pretende significar el primero y todos los descendientes posteriores de un cruce con una planta de la invención que muestra resistencia a la hernia de la col. La progenie de la invención es descendiente de cualquier cruce con una planta de la invención que porta el rasgo que conduce a la resistencia a la hernia de la col.

La “progenie” también abarca plantas que lleven el rasgo de la invención obtenidas de otras plantas de la invención por propagación o multiplicación vegetativa. La progenie no es sólo la primera, sino también todas las generaciones siguientes, siempre que se mantenga la resistencia a la hernia de la col. La progenie típicamente tiene un ancestro que es una planta que tiene la capacidad de mostrar resistencia a la hernia de la col, cuando se cultiva en un campo bajo condiciones infestadas por hernia de la col, o en un ensayo de inoculación de invernadero como se describe en el presente documento, como se encuentra en plantas cultivadas a partir de semillas como se depositan. Un ancestro pretende abarcar no solo la generación inmediatamente anterior a la planta sino también múltiples generaciones anteriores. Más en particular, el ancestro es una planta de la semilla depositada o una generación posterior descendiente de esta.

El término “determinante genético” como se usan en la presente memoria abarca uno o más QTL, genes o alelos. Estos términos se usan indistintamente. Un determinante genético puede identificarse mediante el uso de un marcador molecular. Un determinante genético puede identificarse alternativamente por la posición en un mapa genético, o mediante la indicación de la ubicación en un grupo de ligamiento o cromosoma. Cuando un determinante genético ya no está ligado a un marcador molecular específico pero su posición en un cromosoma definido en un mapa genético está inalterada, este determinante genético sigue siendo el mismo que cuando estaba ligado al marcador molecular. Por lo tanto, el rasgo genético que confiere también sigue siendo el mismo. El “rasgo genético” es el rasgo o característica que es conferido por el determinante genético. El rasgo genético puede identificarse fenotípicamente, por ejemplo, realizando un bioensayo. Sin embargo, también las etapas de las plantas para las que no se puede realizar un ensayo fenotípico llevan la información genética que conduce al rasgo genético. Se puede usar “rasgo” o “rasgo fenotípico” en lugar de “rasgo genético”.

Depósito

Semillas de *Brassica oleracea* var. *italica* Línea 82 que comprende el determinante genético de la invención que confiere la resistencia contra la *Plasmodiophora brassicae* como se describe en el presente documento, se depositaron con NCIMB Ltd, Ferguon Building, Crabaustone 5 Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido, el 27 de Junio de 2011 bajo el número de acceso de depósito NCIMB 41851.

Figura

La Figura 1 muestra esquemáticamente la ubicación de los diferentes QTLs en sus cromosomas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Mapeo de QTL y desarrollo de marcadores

Una gran población que consiste en plantas F2 de *Brassica oleracea* se utilizó para mapear la resistencia a la *Plasmodiophora brassicae*. Estas plantas F2 fueron el resultado de un primer cruce entre la Línea 82 y el grupo de la planta de brócoli susceptible a hernia de la col EA2479 (Rijk Zwaan) y un cruce posterior de autofecundaciones. La población se inoculó con un aislado de hernia de la col que tenía el código ECD 16/3/30 y de acuerdo con el protocolo como se describe en el Ejemplo 3. En total de 163 marcadores de SNP se analizaron, de los cuales se encontró que 154 marcadores eran polimórficos.

Sorprendentemente, se identificaron 2 QTL que contribuyen a la resistencia, ambos colocados en diferentes cromosomas. Los marcadores de SNP moleculares que se correlacionaron más estrechamente a los QTL se presentan en **Tabla 1**.

SEQ ID No: 1 comprende la presencia de un SNP del nucleótido C (tipo salvaje) a A en el cromosoma 3. La posición también se puede indicar como la 42ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en **la Tabla 1**.

SEQ ID No:2 comprende la presencia de un SNP del nucleótido G (tipo salvaje) a C en el cromosoma 8. La posición también se puede indicar como la 40ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en **la Tabla 1**.

SEQ ID No:3 comprende la presencia de un SNP del nucleótido C (tipo salvaje) a G en el cromosoma 3. La posición también se puede indicar como la 42ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en **la Tabla 1**.

SEQ ID No:4 comprende la presencia de un SNP del nucleótido T (tipo salvaje) a C en el cromosoma 3. La posición también se puede indicar como la 41ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 1**.

SEQ ID No:5 comprende la presencia de un SNP del nucleótido C (tipo salvaje) a A en el cromosoma 8. La posición también se puede indicar como la 43ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 1**.

SEQ ID No:6 comprende la presencia de un SNP del nucleótido A (tipo salvaje) a G en el cromosoma 8. La posición también se puede indicar como la 40ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 1**.

Un primer QTL que explicó 18,50 de la variación se ubicó en el cromosoma 3, con una puntuación LOD de 10,24. Se determinó que la posición del QTL estaba entre los marcadores designados como SEQ ID No 3 y SEQ ID No:4, cuya secuencia se encuentra en la **Tabla 1**. En la población F2 y progenie posterior, este QTL se unió más estrechamente a un marcador de SNP designado **SEQ ID No:1**, cuya secuencia se encuentra en la **Tabla 1**. Los bordes de la región QTL preferida pueden determinarse por la presencia de **SEQ ID No:3** y **SEQ ID No:4**.

Un segundo QTL que explicó el 17,0 % de la variación se ubicó en el cromosoma 8, que tiene una puntuación LOD de 9,51. Se determinó que la posición del QTL estaba entre los marcadores designados como **SEQ ID No:5** y **SEQ ID No:6**, cuya secuencia se encuentra en la **Tabla 1**. En la población F2 y la progenie posterior, este QTL se unió más estrechamente a un marcador de SNP designado como **SEQ ID No:2**, cuya secuencia se encuentra en la **Tabla 1**. Los bordes de la región QTL preferida pueden determinarse por la presencia de **SEQ ID No:5** y **SEQ ID No:6**.

Tabla 1

Los marcadores de SNP moleculares basados en el mapa genético específico de la población, que en los números de depósito NCIMB 41815 están enlazados a QTL1 y QTL2, que confieren resistencia a <i>Plasmodiophora brassicae</i> en plantas de <i>Brassica</i> , en particular una planta de <i>Brassica oleracea</i> .		
Designación	Secuencia	QTL relacionado
SEQ ID No. 1 BO00812	ACAGAGTCTTCAAACATTTTCATAGCACGAAGCTGAGTTGC T AGTGTGGTTTCAGGTGCTGCTACTAACATTGTTGGGATG	QTL1
SEQ ID No. 2 BO01026	GTTAGTCTCATAGTTTACATACATACTCTGCTGGTAATAC TCATGGGACGTTGGTGCTGAGTCCATCACGACCGTGTTG	QTL2
SEQ ID No. 3 BO00365	TCAGATTCTCTGAAGTCAATCTTGTGTTCAACACCAGCTT T GTTTATAATTGGCAATCCTACCTCTTCGTATGAGCCTCT	QTL1
SEQ ID No. 4 BO00403	ATCATCTTCCATAGCTTTTACATGCTTTGTGGCTCCACG C TCACTCCAGTTCTGAGAACTTGCCTAACCAACTTCTCG	QTL1
SEQ ID No. 5 BO00829	CTGCTTCCCTTTCCCAAACAAACCTCCAAACCAAGAYCCC GA A CCTGCCTCCGAAGCAGATGAAGTCTCCGGCACAGGC	QTL2
SEQ ID No. 6 BO01007	AATGAGCGAGGACGTGAGCGGGAACAAGTTCTTCGACGAG GCAATGATGGTGGAGCTAGCGCAGCAGACGGGTGATCTG	QTL2

Las secuencias de SNP están vinculadas a los QTL respectivos en NCIMB 41851. Las secuencias de SNP pueden usarse como marcadores moleculares para la resistencia a *Plasmodiophora brassicae* en plantas de *Brassica oleracea* de dicho depósito.

Ejemplo 2

Mapeo ulterior de QTL y desarrollo de marcadores (1)

Una gran población que consiste en 182 F2 *Brassica oleracea* se utilizó para mapear la resistencia a la *Plasmodiophora brassicae*. Estas plantas F2 fueron el resultado de un primer cruce entre la Línea 82 y la planta de coliflor susceptible a la hernia de la col LI5606 (Rijk Zwaan) y un cruce posterior de autofecundación. La población se inoculó con un aislado de hernia de la col que tenía el código ECD 31/31/31 y de acuerdo con el protocolo como se describe en el Ejemplo 3. En total, se analizaron 785 marcadores SNP, de los cuales se encontró que 650 marcadores eran polimórficos.

Sorprendentemente, se identificaron 2 QTL que contribuyen a la resistencia, colocadas en el cromosoma 3 y el cromosoma 4. El QTL en el cromosoma 3 se encontró en la misma región que QTL1 como se describe en el Ejemplo 1. Los marcadores de SNP moleculares que se correlacionaron más estrechamente a los QTL se presentan en la **Tabla 2**.

SEQ ID No:7 comprende la presencia de un SNP del nucleótido G (tipo salvaje) a A en el cromosoma 3. La posición también se puede indicar como la 46ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 2**.

SEQ ID No:8 comprende la presencia de un SNP del nucleótido A (tipo salvaje) a T en el cromosoma 4. La posición también se puede indicar como la 42ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 2**.

SEQ ID No:9 comprende la presencia de un SNP del nucleótido A (tipo salvaje) a G en el cromosoma 3. La posición también se puede indicar como la 40ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 2**.

SEQ ID No:10 comprende la presencia de un SNP del nucleótido C (tipo salvaje) a T en el cromosoma 3. La posición también se puede indicar como la 42ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 2**.

SEQ ID No:11 comprende la presencia de un SNP del nucleótido T (tipo salvaje) a A en el cromosoma 4. La posición también se puede indicar como la 41ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 2**.

SEQ ID No:12 comprende la presencia de un SNP del nucleótido T (tipo salvaje) a G en el cromosoma 4. La posición también se puede indicar como la 43ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 2**.

Un primer QTL que explicó 10,70 de la variación se ubicó en el cromosoma 3, que tiene una puntuación de LPD (el equivalente bayesiano de la puntuación LOD) de 11,2. Se determinó que la posición del QTL estaba entre los marcadores designados como **SEQ ID No:9** y **SEQ ID No:10**, cuya secuencia se encuentra en la **Tabla 2**. En la población F2 y progenie posterior, este QTL se unió más estrechamente a un marcador de SNP designado **SEQ ID No:7**, cuya secuencia se encuentra en la **Tabla 2**. Los bordes de la región QTL preferida pueden determinarse por la presencia de **SEQ ID No:9** y **SEQ ID No:10**.

Un segundo QTL que explicó 7,20 de la variación se ubicó en el cromosoma 4, que tenía una puntuación de LPD de 5,4. Se determinó que la posición del QTL estaba entre los marcadores designados como **SEQ ID No:11** y **SEQ ID No:12**, cuya secuencia se encuentra en la **Tabla 2**. En la población F2 y la progenie posterior, este QTL se unió más estrechamente a un marcador de SNP designado como **SEQ ID No:8**, cuya secuencia se encuentra en la **Tabla 2**. Los bordes de la región QTL preferida pueden determinarse por la presencia de **SEQ ID No:11** y **SEQ ID No:12**.

Mapeo adicional de QTL y desarrollo de marcadores (2)

Una gran población que consiste en 128 F2 *Brassica oleracea* se utilizó para mapear la resistencia a la *Plasmodiophora brassicae*. Estas plantas F2 fueron el resultado de un primer cruce entre la Línea 82 y la planta de brócoli susceptible a hernia de la col EA2749 (Rijk Zwaan) y un entrecruzamiento posterior. La población se inoculó con un aislado de hernia de la col que tenía el código ECD 31/31/31 y de acuerdo con el protocolo como se describe en el Ejemplo 3. En total, se analizaron 785 marcadores SNP, de los cuales se encontró que 564 eran polimórficos. Sorprendentemente, se identificó un QTL que contribuye a la resistencia, situada en el cromosoma 3. El QTL en el cromosoma 3 se encontró en la misma región que QTL1 como se describe en el Ejemplo 1 y anteriormente en el Ejemplo 2. Los marcadores de SNP moleculares que se correlacionaron más estrechamente al QTL se presentan en la **Tabla 2**.

SEQ ID No:13 comprende la presencia de un SNP del nucleótido G (tipo salvaje) a A en el cromosoma 3. La posición también se puede indicar como la 4ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 2**.

SEQ ID No:14 comprende la presencia de un SNP del nucleótido A (tipo salvaje) A T en el cromosoma 3. La posición también se puede indicar como la 43ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 2**.

SEQ ID No:15 comprende la presencia de un SNP del nucleótido T (tipo salvaje) a C en el cromosoma 4. La posición también se puede indicar como la 45ª posición (negrita) en la secuencia de nucleótidos mostrada en la **Tabla 2**.

El QTL, que explicó el 25,4 % de la variación, se ubicó en el cromosoma 3, que tenía una puntuación de LPD de 23,02. Se determinó que la posición del QTL estaba entre los marcadores designados como **SEQ ID No:14** y **SEQ ID No:15**, cuya secuencia se encuentra en la **Tabla 2**. En la población F2 y progenie posterior, este QTL se unió más estrechamente a un marcador de SNP designado **SEQ ID No:13**, cuya secuencia se encuentra en la **Tabla 2**. Los bordes de la región QTL preferida pueden determinarse por la presencia de **SEQ ID No:14** y **SEQ ID No:15**.

Tabla 2

Los marcadores de SNP moleculares basados en el mapa genético específico de la población, que en los números de depósito NCIMB 41815 están unidos a QTL1 y QTL3, que confieren resistencia a <i>Plasmodiophora brassicae</i> en plantas de <i>Brassica</i> , en particular una planta de <i>Brassica oleracea</i> .		
Designación	Secuencia	QTL relacionado
SEQ ID No. 7 BO02081	GGACTAGATTGGAATAGTAACCTAAATGAAGCAATGGAGG ATGAT A AAGAAGAAGTTGTTGGGGCTGCGCAGGTCGAGA	QTL1
SEQ ID No. 8 BO02117	GATWGGGTCATCCGAATCCACACATCCTWCAGCACCTATC T ICTACTAAGTCTATCGTCATAAATAAGAGATCCARAGG	QTL3

Los marcadores de SNP moleculares basados en el mapa genético específico de la población, que en los números de depósito NCIMB 41815 están unidos a QTL1 y QTL3, que confieren resistencia a *Plasmodiophora brassicae* en plantas de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*.

Designación	Secuencia	QTL relacionado
SEQ ID No. 9 BO01881	AGAGGTCCGTGGAATCCCATCTTACTGGATCGACAGTGAG CAACGGATAGGACCTGGGAACAAAATAGCCTATAAGCTCC	QTL1
SEQ ID No. 10 BO02440	GATGTCGGTGTAGAGACCTGGACCTTTCACCATTTTTGCT TTGCTTTGCTTCTACCMAAAGAACAAAAGATACCTCGA	QTL1
SEQ ID No. 11 BO02418	AGCTTGAGCTAGAGCGGAGGAGATGCGCAGGAAGCTAGT AGGATCAGTGACAGAAGGCAGCTCTTTGCTGATTTAGA	QTL3
SEQ ID No. 12 BO01995	CCACTGATGAGCGAAGGCATAAGCYARGGCTCTTTCCCGC TTGATCGTTGCTTCTTCCCTTTGATGTATCCTCCCYAAG	QTL3
SEQ ID No. 13 BO02480	GGACACTTAAAAAACCCTTGCTCTCTTCAATAGCGTTA TAAAGCAAATCAGCTTCTCTGATTCTTCTCTCCACTT	QTL1
SEQ ID No. 14 BO02157	GGAGAAATGAAGCGGAAAGTAAAAACACACACAGATTG AGTTTTTTTTCTTTTACTTTTTCTGTTTTTTTTTTCT	QTL1
SEQ ID No. 15 BO02306	CTCGGCTCTTTTGTGAGAGATACGAAGGTGGCGGAGAT CTACAGCGGCGGGATGAGGAGGGGTCGCCGGATTGCTCT	QTL1

Ejemplo 3

Identificación de plantas de *Brassica oleracea* que han obtenido la resistencia a la hernia de la col

En este ejemplo, se describen pruebas de inoculación. El protocolo general se proporciona, junto con los resultados de los experimentos que usan plantas de la invención y variedades disponibles comercialmente.

En la **Tabla 3**, se da una visión general de los síntomas de infección y las estadías de clasificación de *Plasmodiophora brassicae* infectado en plantas de *Brassica*. Dicha visión general se utiliza fenotípicamente identificando plantas resistentes a la hernia de la col. Además, se presentó que las puntuaciones 2 y 3 a veces se toman conjuntamente, lo que representa un fenotipo de infección intermedio.

Tabla 3.

Descripción general de los síntomas de infección y estadías de clasificación de <i>Plasmodiophora brassicae</i> infectado en plantas de <i>Brassic</i>		
Puntuación	Síntomas	Clasificación
0	Sin síntomas, raíces limpias	Altamente resistente
1	Pequeñas agrupaciones, solo presentes en las raíces laterales	Resistente intermedio
2	Agrupaciones moderadamente dimensionadas, también presentes en la raíz principal	Susceptible intermedio
3	El sistema radical completo está muy infestado con grandes agrupaciones	Altamente susceptible

Para probar si las plantas son resistentes a la hernia de la col o no, aproximadamente 20 semillas por línea se siembran en tierra de turba con una altura de 8 cm, con aproximadamente 2 cm de tierra de siembra encima. Dos a siete días después de la siembra, las plantas se inoculan con 2 ml de esporas que contienen inóculo del *Plasmodiophora brassicae* aislados de interés. Esto puede ser una mezcla de aislados o un solo aislado. En este ejemplo, pruebas de enfermedad con un inóculo que contiene un único *Plasmodiophora brassicae* aislado. Después de la inoculación, las plantas no se riegan durante 2 a 3 días para evitar que las esporas se eliminen. Sucesivamente, las plantas inoculadas se cultivan durante 5 a 6 semanas en condiciones de invernadero para darte a una temperatura de 23 a 25 °C.

Ejemplo 4

Durante una prueba de la enfermedad hernia de la col, se sembraron variedades conocidas susceptibles y resistentes para comprobar si se cumplían las condiciones generales para una prueba de enfermedad exitosa y confiable. Para la identificación de aislados de hernia de la col se utiliza el conjunto ECD (European Clubroot Differential - Diferencial Europeo para Hernia de la Col). Este conjunto consiste en 5 cultivares, seleccionados de cada una de las tres especies de *Brassica*: *B. rapa*, *B. napus* y *B. oleracea*.

Por tanto, en total, se tuvieron en cuenta 15 cultivares. Se hace referencia a estos en la **Tabla 4** con los números 1 a 15 en la columna “Números diferenciales”. Si en una prueba de enfermedad, tal variedad cultivada se encuentra susceptible de un aislado probado, el número denario correspondiente se añade con el número denario de otras variedades cultivadas susceptibles de esta especie de *Brassica* específica. De esta manera, se pueden calcular tres números para las tres especies de *Brassica*.

En la **Tabla 4** se dan los resultados de una prueba de enfermedad. En este ensayo, se probó un aislado específico designado PLA-DE1145, en el conjunto ECD, en plantas de la invención (t1) y en plantas de la variedad “Janin” (t2). En la columna designada “PLA-DE1145” los resultados se enumeran en el siguiente orden de puntuación: 0, 1-2, 3. Por lo tanto, en este experimento las puntuaciones 1 y 2 se toman juntas en un grupo. La prueba diferencial mostró que la variedad “Janin” es susceptible del aislado designado PLA-DE1145, que se asigna al código 31/31/31 de acuerdo con el conjunto ECD. Se demostró que las plantas de la invención eran resistentes.

Tabla 4

Descripción general de los resultados de una prueba diferencial para hernia de la col usando el aislado <i>Plasmodiophora brassicae</i> PLA-DE1145					
Número diferencial	Brassica	Acceso	Número denario	PLA-DE1145	Código
	<i>rapa</i> var.				
1	<i>pekinensis rapa</i> var.	aaBBCC	1	2-0-12	31
2	<i>pekinensis rapa</i> var.	AabbCC	2	2-0-11	
3	<i>pekinensis rapa</i> var.	AABBcc	4	2-4-5	
4	<i>pekinensis rapa</i> var.	AABBCC	8	2-1-10	
5	<i>pekinensis</i>	Granaat	16	0-0-15	
6	<i>napus</i>	Nevin	1	0-0-14	31
7	<i>napus</i>	Giant Rape	2	0-0-13	
8	<i>napus</i>	Línea Dc126 Hernia de la col	4	0-0-15	
9	<i>napus</i>	Resistente	8	0-0-13	
10	<i>napus</i>	Wilhelmsburger	16	0-0-15	
	<i>oleracea</i> var.				
11	<i>capitata oleracea</i> var.	Badger Shipper	1	0-0-13	31
12	<i>capitata oleracea</i> var.	Sachsener	2	0-4-8	
13	<i>capitata oleracea</i> var.	Jersey Queen	4	0-0-15	
14	<i>capitata oleracea</i> var.	Septa	8	0-0-13	
15	<i>fimbriata</i>	Verheul	16	0-0-10	
t1		Line 82		10-1-2	
t2		Janin		0-0-15	

En la **Tabla 5**, se dan los resultados de un experimento de inoculación con la cepa de *Plasmodiophora brassicae* 31/31/31. En esta prueba, las cepas disponibles comercialmente “Clarify” y “Clapton” se prueban con el aislado de hernia de la col que se denominó 31/31/31 de acuerdo con la prueba de ECD mencionada en la **Tabla 4**. A partir de la **Tabla 5**, se deduce que “Clapton” y “Clarify” se pueden considerar susceptibles para este aislado de hernia de la col.

Tabla 5

Resultados de un experimento de inoculación con <i>Plasmodiophora brassicae</i> cepa 31/31/31		
Variedad	Gráfico	Resultado
Clarify	86	4/0/0/25
Clarify	150	0/0/0/28
Clarify	253	0/0/2/27
Clarify	11	0/7/0/17
Clarify	165	0/0/8/16
Clapton	71	2/0/0/20
Clapton	92	0/0/0/22
Clapton	12	1/5/0/18
Clapton	166	1/2/5/18

REIVINDICACIONES

1. Una planta de *Brassica*, en particular una planta de *Brassica oleracea*, que porta un determinante genético que comprende QTL1 y/o QTL2 y/o QTL3, que confiere resistencia contra *Plasmodiophora brassicae*, y cuyo determinante genético está presente en plantas que se cultivan a partir de semillas que se depositaron con el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41851, en donde dicho determinante genético como está presente en plantas que se cultivan a partir de las semillas del depósito NCIMB 41851 comprende:
 - QTL1, ubicado en el cromosoma 3 entre el marcador BO00365 (SEQ ID NO:3) y el marcador BO00403 (SEQ ID NO:4) y unido al marcador BO00812 (SEQ ID NO:1); o
 - QTL1, ubicado en el cromosoma 3, entre el marcador BO01881 (SEQ ID No:9) y el marcador BO02440 (SEQ ID No:10) y unido al marcador BO02081 (SEQ ID No:7); o
 - QTL1, ubicado en el cromosoma 3, entre el marcador BO02157 (SEQ ID No:14) y marcador BO02306 (SEQ ID No:15) y unido al marcador BO02480 (SEQ ID No:13); y/o
 - QTL2, ubicado en el cromosoma 8 entre el marcador BO00829 (SEQ ID No:5) y el marcador BO1007 (SEQ ID No:6) y unido al marcador BO01026 (SEQ ID No:2); y/o
 - QTL3, ubicado en el cromosoma 4 entre el marcador BO02418 (SEQ ID No:11) y BO01995, (SEQ ID No:12) y unido al marcador BO02117 (SEQ ID No:8).
2. La planta de *Brassica* según la reivindicación 1 que comprende QTL1 y opcionalmente QTL2 y/o QTL3, todos preferiblemente en estado homocigoto, y es resistente a *Plasmodiophora brassicae*.
3. Semilla que comprende el determinante genético como se define en la reivindicación 1 o 2.
4. Semilla como se reivindica en la reivindicación 3, en donde la planta que puede crecer a partir de la semilla es resistente a *Plasmodiophora brassicae*.
5. Planta de progenie de una planta de *Brassica* según la reivindicación 1 o 2, o la progenie de plantas cultivadas a partir de semillas como se reivindica en la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde la planta comprende el determinante genético como se define en la reivindicación 1 o 2.
6. Planta de progenie como se reivindica en la reivindicación 5, en donde la planta de progenie es resistente a *Plasmodiophora brassicae*.
7. Material de propagación derivado de una planta según la reivindicación 1 o 2, en donde el material de propagación comprende el determinante genético como se define en la reivindicación 1 o 2.
8. Material de propagación capaz de convertirse en una planta según la reivindicación 1 o 2.
9. Material de propagación según la reivindicación 7 u 8, en donde el material de propagación se selecciona de un grupo que consiste en microsporas, polen, ovarios, óvulos, embriones, sacos embrionarios, óvulos, esquejes, raíces, puntas de raíces, hipocotilos, cotiledones, tallos, hojas, flores, anteras, semillas, células meristemáticas, protoplastos y células.
10. Cultivo de tejidos de material de propagación según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
11. Parte cosechada de planta de *Brassica* según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, que se selecciona en particular del grupo que consiste en cabeza de col, binza, tallo, hoja, brote, semilla, opcionalmente en forma procesada, en donde la parte porta el determinante genético como se define en la reivindicación 1 o 2.
12. Uso de los marcadores como se define en la reivindicación 1 o 2 para identificar plantas resistentes a *Plasmodiophora brassicae*, o desarrollan otros marcadores unidos al determinante genético como se define en la reivindicación 1 o 2.

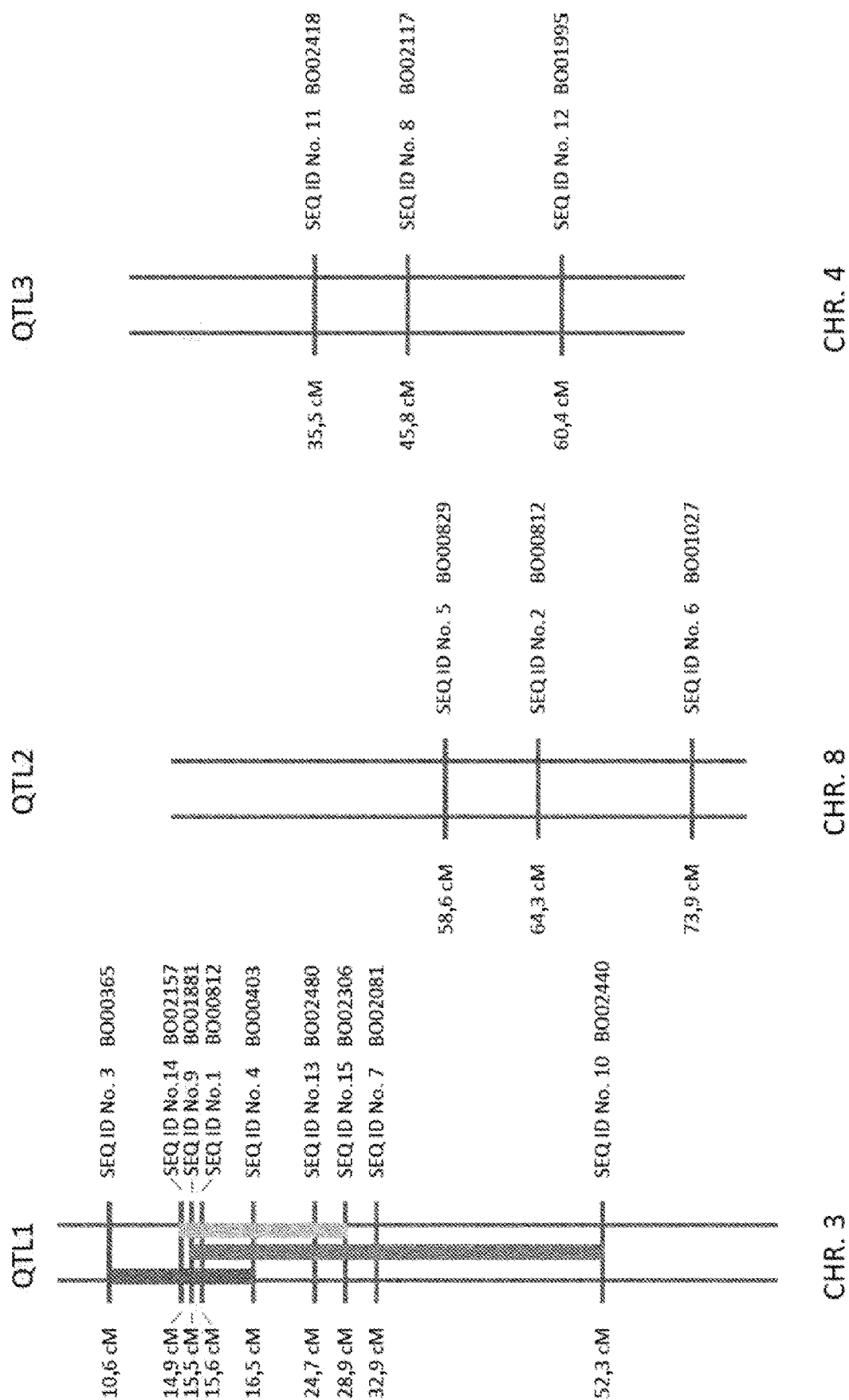


Figura 1