

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 475**

51 Int. Cl.:

A01H 6/14 (2008.01)

A01H 5/00 (2008.01)

A01H 5/12 (2008.01)

C12N 15/65 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2013** **PCT/EP2013/053367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013** **WO13124310**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2013** **E 13704964 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 2816891**

54 Título: **Genes R en fase de acoplamiento**

30 Prioridad:

20.02.2012 EP 12156259

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

12.06.2024

73 Titular/es:

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

Burgemeester Crezeelaan 40
2678 KX De Lier, NL

72 Inventor/es:

THABUIS, ARNAUD PAUL PIERRE;
SCHUT, JOHANNES WILHELMUS y
VOGELAAR, ARIE

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

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

ES 2 972 475 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

Genes R en fase de acoplamiento

- 5 La invención se refiere a plantas y partes de plantas, en particular plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), que son resistentes a *Bremia lactucae*. La invención se refiere también a las semillas de estas plantas capaces de producir plantas resistentes a *Bremia lactucae*. La invención se refiere también al uso de marcadores para identificar dichas plantas y a un proceso para identificar dichas plantas.
- 10 El mildiu vellosa es una plaga grave en todo el mundo, en la producción de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) tanto en invernadero como en campo abierto. El mildiu vellosa de la lechuga está producido por el hongo *Bremia lactucae*, perteneciente a una clase de hongos relativamente primitivos conocidos como Oomicetos. El hongo es un parásito obligado capaz de infectar una planta de lechuga en cualquier etapa de crecimiento desde la plántula hasta la planta madura.
- 15 La coevolución de la planta y el patógeno ha dado lugar a una carrera armamentística en la que la resistencia de la planta puede quebrarse como consecuencia de la capacidad del patógeno para interactuar y modificar dianas alternativas en el hospedador o bien las mismas dianas de una forma diferente.
- 20 Una técnica de reproducción para ralentizar el rápido aumento de virulencia de la población de *Bremia* es asociar diferentes genes de resistencia a *Bremia* (también llamado piramidación o apilamiento). Un límite de esta estrategia es que los diferentes genes de resistencia a *Bremia* (genes R) están agrupados en un número limitado de ubicaciones. Dichas ubicaciones se denominan grupos de genes de resistencia. En la lechuga, se conocen al menos 4 grupos de genes de resistencia principales que se encuentran en el cromosoma 1, cromosoma 2,
- 25 cromosoma 4 y cromosoma 8, respectivamente. Los genes R del mismo grupo pueden segregarse como alelos o genes estrechamente vinculados. Por lo tanto, a menudo es imposible apilar genes R del mismo grupo, porque los genes en el mismo grupo están en fase de repulsión entre sí, y se heredan como alelos alternativos del mismo locus. Durante la reproducción de la lechuga, que es un cultivo diploide, la oportunidad de piramidar genes dominantes de *Bremia* en el mismo grupo de genes de resistencia está por tanto limitado a un máximo de dos genes por grupo. Este máximo solo puede alcanzarse en plantas heterocigóticas con una única copia para cada gen. Sin embargo, proporcionar plantas de lechuga heterocigóticas a los productores implica el uso de variedades híbridas. Desafortunadamente, la producción de semillas híbridas de lechuga se considera demasiado cara, con demasiado riesgo y demasiado complicada. Por lo tanto, en la práctica, casi todas las variedades de lechuga son líneas endogámicas. En una línea endogámica, el número de genes por grupo se limita a uno, que a continuación
- 35 está presente en un estado homocigótico con dos copias del gen.
- Como se ha mencionado anteriormente, existe una carrera armamentística continua entre la planta y el patógeno y, durante esta carrera, los genes R se rompen constantemente y los fitogenetistas necesitan fuentes de resistencia alternativas para seguir produciendo variedades resistentes. Cada nueva combinación de genes R es,
- 40 por lo tanto, un valioso activo para el fitogenetista.
- Dadas las ventajas significativas de apilar genes R, es el objeto de la presente invención proporcionar plantas de lechuga con una nueva combinación de genes R en fase de acoplamiento, que previamente se habían descubierto solamente en la fase de repulsión, heredados como alelos alternativos y, por lo tanto, no apilables.
- 45 En la investigación que condujo a la presente invención se desarrollaron nuevas plantas de lechuga que tenían en su genoma los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento. Estos tres genes R están en el grupo de resistencia del cromosoma 2 de *Lactuca sativa* L. Juntos, estos genes transmiten resistencia a las razas Bl:1, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y
- 50 Bl:28 de *Bremia lactucae*.
- Aunque se puede obtener un perfil de resistencia similar al combinar otros genes R, la ventaja de tener estos tres genes en fase de acoplamiento es el hecho de que las posibilidades de un grupo de genes de resistencia se usan más ampliamente y que el fitogenetista tiene a disposición nuevas posibilidades de apilamiento, ralentizando la virulencia del patógeno.
- 55 La invención se refiere por lo tanto a una planta de lechuga resistente a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25, y Bl:28 de *Bremia lactucae*, planta que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento y que transmiten resistencia a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* y que no transmiten resistencia a las razas Bl:20 y Bl:26 y Bl:27 de *Bremia lactucae*, y cuyos genes R se pueden obtener mediante introgresión de una planta cultivada a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761, y en donde los dichos genes R en las semillas de la semilla con número de depósito NCIMB 41761 están al menos vinculados al marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4, al marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5, y al marcador LK0036 con la Id. de sec. n.º 6, y opcionalmente también a uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que
- 60
- 65

consiste en el marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1, el marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, el marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, el marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7 y el marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.

La invención comprende además una planta de lechuga resistente a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae*, en donde dicha resistencia se transmite por uno de los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento que transmite resistencia a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas Bl:20, Bl:26, y Bl:27 de *Bremia lactucae*, y en donde dichos genes R en plantas cultivadas a partir de semillas depositadas con el número de registro NCIMB 41761 se pueden identificar por la presencia del marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4, del marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5, y del marcador LK0036 con la Id. de sec. n.º 6, y opcionalmente también a los marcadores seleccionados del grupo que consiste en el marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1, el marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, el marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, el marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7 y el marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.

En una realización concreta, el determinante genético comprende los genes Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento. Por lo tanto, la presente invención proporciona una combinación nueva y única de genes R, lo que proporciona a los fitogenetistas una nueva alternativa para desarrollar variedades de lechuga resistentes a *Bremia lactucae*.

Por lo tanto, la presente invención proporciona plantas de lechuga que son resistentes a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae*, en donde dicha resistencia se transmite mediante los genes R Dm3, Dm6 y R18, que están presentes en fase de acoplamiento en un determinante genético, que es como se encuentra en las plantas cultivadas a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa en el depósito del NCIMB con el número de registro NCIMB 41761 el 29 de septiembre de 2010.

La combinación de estos genes R procedentes del mismo grupo, de manera que están en fase de acoplamiento en lugar de en fase de repulsión, ofrece muchas ventajas. Los genes R en fase de acoplamiento pueden considerarse como un nuevo supergen R que transmite resistencia frente a más razas de *Bremia lactucae*. Además, la herencia de los genes R en la fase de acoplamiento es similar a la de un único gen y, por lo tanto, aumenta la eficacia de la reproducción.

Por lo tanto, la invención se refiere a una planta de lechuga que tiene los tres genes R Dm3, Dm6 y R18, presentes en su genoma en fase de acoplamiento, de manera que los tres genes R se heredan juntos de manera dominante como un alelo único.

En una realización, la planta de lechuga de la invención lleva los genes R Dm3, Dm6 y R18 como un alelo único como está presente en el genoma de las semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761, cuyo alelo produce resistencia contra al menos las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae*.

Según un aspecto adicional de la misma, la invención proporciona los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento que, por lo tanto, se comportan como un alelo de un único gen dominante. Las resistencias frente a las razas de *Bremia* cubiertas por los genes R Dm3, Dm6 y R18 separados y esos genes R en fase de acoplamiento se especifican en la **Tabla 1**. Las resistencias frente a las seis razas de *Bremia* se transmiten mediante más de un gen R, las resistencias frente a las restantes razas de *Bremia* se transmiten mediante un único gen R. Las resistencias específicas de Dm3 son frente a las razas de *Bremia* Bl:18, Bl:22, Bl:24, Bl:25 y Bl:28. La única resistencia específica de Dm6 es frente a Bl:17. Las resistencias transmitidas específicamente por R18 son frente a las razas de *Bremia* Bl:2, Bl:7, Bl:10, Bl:14, Bl:21 y Bl:23 (Véase la **Tabla 1**).

Tabla 1

Resistencias transmitidas por los genes R Dm3, Dm6 y R18 por separado y en fase de acoplamiento	
-	indica una reacción de resistencia
(-)	indica también una reacción de resistencia, pero en el ensayo de las plántulas se puede observar una cantidad muy limitada de esporulación
+	indica una reacción de susceptibilidad
*	Resistencia única para Dm3
**	Resistencia única para Dm6

*** Resistencia única para R18				
Cepa de <i>Bremia lactucae</i>	Gen R Dm3	Gen R Dm6	Gen R R18	Dm3 + Dm6 + R18 en fase de acoplamiento
Bl:1	-	-	-	-
Bl:2	+	+	(-)	(-)
Bl:4	-	(-)	(-)	-
Bl:5	+	-	-	-
Bl:6	-	(-)	-	-
Bl:7	+	+	_***	-
Bl:10	+	+	_***	-
Bl:12	-	+	-	-
Bl:13	+	(-)	-	-
Bl:14	+	+	_***	-
Bl:15	+	-	-	-
Bl:16	+	+	_***	-
Bl:17	+	_**	+	-
Bl:18	_*	+	+	-
Bl:20	+	+	+	+
Bl:21	+	+	_***	-
Bl:22	_*	+	+	-
Bl:23	+	+	_***	-
Bl:24	*	+	+	-
Bl:25	_*	+	+	-
Bl:26	+	+	+	+
Bl:27	+	+	+	+
Bl:28	_*	+	+	-

Una planta de lechuga resistente a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* puede comprender una introgresión que comprende Dm3, Dm6 y R18, en donde dicha introgresión se puede obtener de una planta de lechuga cuya semilla representativa se deposita en el NCIMB con el número de registro NCIMB 41761 y en donde la dicha introgresión en las semillas de la semilla con número de depósito NCIMB 41761 está vinculada al marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1, y al marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, y al marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, y al marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4, y al marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5, y preferiblemente también al marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7 y al marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.

Una planta de lechuga resistente a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* puede comprender una introgresión que puede obtenerse a partir de una planta de lechuga cuyas semillas representativas se depositaron en el NCIMB con el número de registro NCIMB 41761, cuya introgresión comprende los genes Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento vinculados al marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1 y al marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, y al marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, y al marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4, y al marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5, y preferiblemente también al marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7 y al marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.

Una introgresión en este sentido se refiere a una parte del cromosoma 2 que comprende los genes de resistencia Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento.

Los marcadores SCM05, LR0029 y LK0036 juntos proporcionan un patrón de haplotipo que es único para los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento, como se encuentra en las semillas del depósito, que se depositaron en el NCIMB con el número de registro NCIMB 41761. El dicho haplotipo es, por lo tanto, predictivo para los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento tal como se encuentran en las semillas del dicho depósito. El haplotipo puede extenderse con uno o más de los marcadores SCW09, CL922, SCV12, LR0096 y SCI11. Otros haplotipos más extendidos consisten así, por ejemplo en los marcadores SCW09, CL922, SCV12,

SCM05, LR0029 y LK0036 o los marcadores SCW09, CL922, SCV12, SCM05, LR0029, LK0036, LR0096 y SCI11 u otras combinaciones que siempre comprenden al menos SCM05, LR0029 y LK0036 y uno o más de los marcadores SCW09, CL922, SCV12, LR0096 y SCI11. Los haplotipos extendidos son también predictivos para los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento como se encuentra en las semillas del depósito que se depositaron en el NCIMB con el número de registro NCIMB 41761 y pueden conducir a una mejor identificación de la presencia de los genes R.

En la **Tabla 4** se mencionan las secuencias de los marcadores y en la **Tabla 5** se mencionan los cebadores correspondientes que se pueden usar para amplificar los marcadores.

Los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento se pueden identificar en plantas cultivadas a partir de semillas depositadas con el número de registro NCIMB 41761 por un haplotipo único que comprende al menos el marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4, el marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5, y el marcador LK0036 con la Id. de sec. n.º 6, y opcionalmente también los marcadores seleccionados del grupo que consiste en el marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1, el marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, el marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, el marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7 y el marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.

En una realización, la invención se refiere a una planta de lechuga, que es resistente a las razas Bl:1, Bl:2 Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas Bl:20 y Bl:26 y Bl:27 de *Bremia lactucae*, y donde dicha planta se puede obtener cruzando una planta de lechuga cultivada a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa en el NCIMB con el número de registro NCIMB 41761, y seleccionando en la progenie F2 del cruce que se obtiene tras cruzar F1 consigo mismo o con otra planta para obtener plantas que muestran resistencia a las razas Bl:1, Bl:2 Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae*.

En una planta de lechuga resistente a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas Bl:20, Bl:26, y Bl:27 de *Bremia lactucae*, dicha resistencia se transmite por los genes de resistencia Dm3, Dm6 y R18, genes que están presentes en forma homocigótica, en donde dichos genes se pueden obtener mediante introgresión de dichos genes de una planta cultivada a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa en el NCIMB con el número de registro NCIMB 41761, y en donde dichos genes de resistencia están presentes en la semilla del número de registro NCIMB 41761 y están vinculados al marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1, y al marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, y al marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, y al marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4 y al marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5 y preferiblemente también al marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7 y al marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.

Cuando los genes R no están en fase de acoplamiento sino en fase de repulsión, se puede encontrar un patrón de resistencia similar solo en una planta que comprende los genes R en estado heterocigótico. Este es, por ejemplo, el caso en que una planta que comprende el gen de resistencia Dm3 en estado homocigótico se cruza con una planta que comprende Dm6 y R18 en estado homocigótico. Se obtiene una F1 completamente heterocigótica que comprende todos los genes R, pero en los diferentes cromosomas homólogos. Cuando las plantas de dicha F1 se autofecundan (**Fig. 2**), se obtiene una F2 que consta de 500 de plantas completamente resistentes a todas las razas de *Bremia lactucae* cubiertas por los genes R Dm3, Dm6 y R18; 250 de las plantas de la F2 solo cubren las resistencias frente a la *Bremia lactucae* cubierta por Dm3 (véase la **Tabla 1**); y las 250 plantas restantes son solo resistentes a aquellas razas cubiertas por los genes R Dm6 y R18 (véase la **Tabla 1**). Si la F2 se somete a ensayo con una mezcla de las tres razas de *Bremia lactucae* únicas para cada gen R (por ejemplo, Bl:16, Bl:17 y Bl:18), 500 plantas se consideran resistentes, mientras que el resto mostraría síntomas de infección.

Una planta de la invención que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento mostraría un resultado diferente. Cuando una planta que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento en estado homocigótico se cruza con una planta completamente susceptible, todas las plantas F1 serían heterocigóticas y completamente resistentes a las razas de *Bremia lactucae* cubiertas por los tres genes R. La autofecundación de F1 producirá una población F2 que consiste en 750 plantas resistentes y 250 plantas completamente susceptibles (**Fig. 1**), a diferencia de una F2 que comprende los genes R en fase de repulsión como se ha descrito anteriormente y en la **Fig. 2**. Los genes R Dm3, Dm6 y R18, cuando están en fase de acoplamiento, se comportan por tanto como un único gen dominante.

La distinción de una planta que comprende los genes R en fase de acoplamiento de forma heterocigótica procedentes de una planta que comprende los genes R en la fase de acoplamiento en forma homocigótica puede realizarse por autofecundación de la planta, lo que da como resultado una descendencia endogámica, por ejemplo, la autofecundación de la planta F2 que se muestra en **Fig. 1** en una población F3, y la selección de aquellas plantas a partir de F2 de las cuales la descendencia endogámica completa no es susceptible a ninguna de las razas de *Bremia* cubiertas por los genes R Dm3, Dm6 y R18 como se representa en **Tabla 1**, o la selección

de cualquier planta de dicha descendencia endogámica de la que todas las plantas son resistentes frente a las razas de *Bremia* cubiertas por los genes R Dm3, Dm6 y R18 como se representa en **Tabla 1**.

En una planta de lechuga resistente a las razas B1:1, B1:2, B1:4, B1:5, B1:6, B1:7, B1:10, B1:12, B1:13, B1:14, B1:15, B1:16, B1:17, B1:18, B1:21, B1:22, B1:23, B1:24, B1:25 y B1:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas B1:20, B1:26, y B1:27 de *Bremia lactucae*, dicha resistencia se transmite por los genes de resistencia Dm3, Dm6 y R18, genes que están presentes en forma homocigótica, en donde dichos genes se pueden obtener mediante

a) cruzamiento de una planta susceptible con una planta cultivada a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761.

b) autofecundación de las plantas de la progenie F1 para obtener plantas de la progenie F2;

c) selección de las plantas F2 que son resistentes a dichas razas de *Bremia lactucae*;

d) autofecundación de cada una de las plantas F2 seleccionadas para obtener una población de la progenie F3;

e) selección de aquellas plantas en la F2 de las cuales todas las plantas de la progenie F3 son resistentes a dichas razas de *Bremia lactucae* como plantas que tienen la dicha resistencia en forma homocigótica, o selección de una planta de una población F3 no segregada para la dicha resistencia;

Otro aspecto se refiere a una planta de lechuga resistente a las razas B1:1, B1:2, B1:4, B1:5, B1:6, B1:7, B1:10, B1:12, B1:13, B1:14, B1:15, B1:16, B1:17, B1:18, B1:21, B1:22, B1:23, B1:24, B1:25 y B1:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas B1:20, B1:26, y B1:27 de *Bremia lactucae*, en donde dicha resistencia es transmitida por los genes de resistencia Dm3, Dm6 y R18 que están presentes en fase de acoplamiento y dichos genes están presentes en forma heterocigótica, en donde dicha planta de lechuga se puede obtener a partir de un cruce entre una planta de lechuga susceptible con una planta cultivada a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761.

Las semillas depositadas con el NCIMB 41761 comprenden los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento, que están vinculados en las semillas del depósito de semillas al marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1, y al marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, y al marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, y al marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4 y al marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5, y preferiblemente también al marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7 y al marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.

En ausencia de marcadores moleculares, o en el caso de que la recombinación entre los marcadores moleculares y los genes R tenga lugar y por tanto ya no sea predictiva, aún puede determinarse la equivalencia de los genes R mediante una prueba de alélismo. Para realizar una prueba de alélismo, el material que es homocigótico para el determinante conocido, una planta de prueba, se cruza con material que es homocigótico para los genes R que se van a someter a prueba. Esta última planta se denomina planta donante. La planta donante que se va a someter a prueba debe ser o debe hacerse homocigótica para los genes R que se van a someter a prueba. La persona experta sabe cómo obtener una planta que sea homocigótica para los genes R que se va a someter a prueba. Cuando en la F2 del cruce entre una planta donante y una planta de prueba no se observa segregación para el fenotipo relacionado con los genes R, los genes R de la planta donante y la planta de prueba se consideran equivalentes.

Se proporciona una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento y, por tanto, cuando se cruza con una planta de prueba que comprende los dichos genes en fase de acoplamiento, cuya semilla representativa se depositó en el NCIMB con los números de registro NCIMB 41761, o una planta progenie de la misma que comprende los genes R en fase de acoplamiento comprendidos en semillas de plantas de lechuga representativas que se depositaron con el número de registro NCIMB 41761 o una planta derivada de la misma y que comprende los dichos genes R en fase de acoplamiento, las plantas de la progenie de primera generación (F1) de dicho cruce no muestran segregación para la resistencia frente a las razas B1:1, B1:2, B1:4, B1:5, B1:6, B1:7, B1:10, B1:12, B1:13, B1:14, B1:15, B1:16, B1:17, B1:18, B1:21, B1:22, B1:23, B1:24, B1:25 y B1:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas B1:20, B1:26, y B1:27 de *Bremia lactucae*.

Tanto en la planta de prueba como en la planta de la invención, los genes R que comprenden los tres genes R en fase de acoplamiento están presentes en una condición homocigótica. Las plantas de la segunda generación y generaciones posteriores, si se obtienen mediante autofecundación, tampoco muestran segregación para el dicho patrón de resistencia. La planta de prueba puede ser una planta cuya semilla representativa se depositó en el NCIMB con el número de registro NCIMB 41761. Cuando los genes R responsables de la resistencia frente a las razas B1:1, B1:2, B1:4, B1:5, B1:6, B1:7, B1:10, B1:12, B1:13, B1:14, B1:15, B1:16, B1:17, B1:18, B1:21, B1:22, B1:23, B1:24, B1:25 y B1:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas B1:20, B1:26, y B1:27 de *Bremia lactucae* como están comprendidas en el depósito están presentes en una planta, la planta es una planta de la invención.

A diferencia del resto de razas de *Bremia lactucae* contra las que los genes R Dm3, Dm6 y R18 transmiten resistencia, la raza Bl:2 puede mostrar una cantidad muy limitada de esporulación en la prueba de plántulas. Sin embargo, en la práctica, las plantas de la invención también son resistentes frente a Bl:2 a pesar del hecho de que puede producirse una cantidad limitada de esporulación en la prueba de las plántulas.

Además de las resistencias frente a las razas Bl:1, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:13, Bl:15 y Bl:17 de *Bremia* (véase la **Tabla 1**), el gen Ra, estrechamente vinculado al gen R Dm6, también transmite resistencia contra el pulgón de la raíz (*Pemphigus bursarius*).

Por lo tanto, la invención se refiere también a plantas de lechuga resistentes a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas Bl:20, Bl:26, y Bl:27 de *Bremia lactucae* y resistentes al pulgón de la raíz (*Pemphigus bursarius*) resistencias que se transmiten mediante los genes R Dm3, Dm6, Ra y R18 presentes en la fase de acoplamiento en el cromosoma 2 en la planta de la invención.

En un aspecto adicional, se proporcionan plantas de lechuga que son resistentes a las razas Bl:1, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:23, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* y resistentes a la raza Bl:2 de *Bremia lactucae* y al pulgón de la raíz (*Pemphigus bursarius*), resistencias que se transmiten mediante los genes R Dm3, Dm6, Ra y R18 presentes en la fase de acoplamiento en el cromosoma 2 en la planta de la invención.

Según un aspecto adicional de la misma, la invención se refiere al material de propagación capaz de crecer en una planta de la invención.

En una realización, dicho material de propagación está formado por la semilla de una planta de lechuga de la invención, en donde la planta que puede crecer a partir de la semilla es resistente a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas Bl:20, Bl:26, y Bl:27 de *Bremia lactucae*.

En otra realización, el material de propagación capaz de crecer en una planta de la invención se selecciona del 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.

En una realización adicional, la invención se refiere a un cultivo tisular de material de propagación capaz de crecer en una planta de la invención.

De manera adecuada, la planta producida a partir del material de propagación muestra la resistencia a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas Bl:20, Bl:26, y Bl:27 de *Bremia lactucae*, en particular la resistencia que se encuentra en *Lactuca sativa* 10G.913566, cuyas semillas representativas se depositaron en el NCIMB con el número de registro NCIMB 41761.

La invención también se refiere a la descendencia de las plantas, células, tejidos y semillas de la invención. Tal descendencia puede ser en sí misma plantas, células, tejidos o semillas. Como se utiliza en la presente memoria, la palabra “progenie” pretende indicar los primeros y todos los demás descendientes de un cruce con una planta de la invención que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento. La “progenie” también abarca plantas que llevan el rasgo de la invención y obtenidas de otras plantas o progenie de las plantas de la invención por propagación o multiplicación vegetativa.

En una realización, la invención se refiere a la progenie de una planta de lechuga de la invención, en donde la planta de progenie es resistente a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas Bl:20, Bl:26, y Bl:27 de *Bremia lactucae*.

Se describe también en la presente memoria la cabeza de una planta de lechuga de la invención.

Además, en la presente memoria se describe un producto alimenticio, que comprende la cabeza de la lechuga o partes de la misma, opcionalmente en forma procesada. En particular, el producto alimenticio comprende hojas de la planta de lechuga o partes de la misma. El producto alimenticio es, por ejemplo, una ensalada o una mezcla de ensaladas que comprende hojas de la planta de lechuga de la invención.

Los marcadores vinculados a los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento se desarrollaron en una población de plantas F2 que segregan el rasgo de la invención, usando marcadores públicamente disponibles que abarcan una gran parte del grupo de resistencia a *Bremia* en el cromosoma 2. Los marcadores enumerados en la **Tabla 4** formaron un haplotipo único que predice la presencia de genes R Dm3, Dm6 y R18 en la fase de

acoplamiento. La **Tabla 4** enumera las secuencias de los marcadores y la **Tabla 5** los cebadores correspondientes utilizados para amplificarlos.

Además, en la presente memoria se describe una molécula de ácido nucleico causante de la resistencia frente las razas BI:1, BI:2, BI:4, BI:5, BI:6, BI:7, BI:10, BI:12, BI:13, BI:14, BI:15, BI:16, BI:17, BI:18, BI:21, BI:22, BI:23, BI:24, BI:25 y BI:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas BI:20, BI:26, y BI:27 de *Bremia lactucae*, que comprende una secuencia de ADN que comprende los tres genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento, secuencia de ADN que se sitúa en el cromosoma 2 y está vinculada al marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1, y al marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, y al marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, y al marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4 y al marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5, y preferiblemente también al marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7 y al marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.

La invención se refiere además al uso del marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1, y el marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, y el marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, y el marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4, y el marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5, y preferiblemente también el marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7, y el marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8 para la identificación de plantas que comprenden los genes Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento que transmiten resistencia a *Bremia lactucae*.

La invención también se refiere al uso de dichos marcadores para desarrollar otros marcadores vinculados a los genes Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento que transmiten resistencia a *Bremia lactucae*.

En un aspecto, la invención se refiere a un proceso para identificar plantas de lechuga que comprenden los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento que comprende la etapa de seleccionar dichas plantas de lechuga entre una población de plantas de lechuga segregadas para estos genes en fase de acoplamiento usando el marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1, y el marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, y el marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, y el marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4 y el marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5, y preferiblemente también el marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7 y el marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.

Las plantas de lechuga portadoras de los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento pueden haber adquirido dicho determinante por introducción de la información genética responsable del rasgo procedente de una fuente adecuada, ya sea por mejora convencional, o por modificación genética, en particular por 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 cruzable o un gen sintético.

El germoplasma de las plantas de la invención está constituido por todas las características heredadas de un organismo y según la invención abarca al menos los genes R de la invención. El germoplasma se puede usar en un programa de reproducción para el desarrollo de plantas de lechuga resistentes a *Bremia lactucae*.

Además, en la presente memoria se describe un método para la producción de una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento, que comprende

- a) cruzar una planta que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento con otra planta;
- b) autofecundar la F1 resultante para obtener plantas F2;
- c) seleccionar plantas que comprenden los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento en la F2;
- d) realizar opcionalmente una o más rondas adicionales de autofecundación o cruce, y posteriormente selección, de una planta que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento.

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.

En la presente memoria se describe un método para la producción de una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento, que comprende

- a) cruzar una planta que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento con otra planta;
- b) retrocruzar opcionalmente la F1 resultante con el progenitor preferido;

c) seleccionar plantas que comprenden los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento en la F2 o BC1;

d) realizar opcionalmente una o más rondas adicionales de autofecundación o cruce o retrocruzamiento, y posteriormente selección, de una planta que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento.

Además, en la presente memoria se describe un método para introducir un rasgo deseado en una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento, que comprende:

a) cruzar una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento, cuya semilla representativa se depositó en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41761, con una segunda planta de lechuga que comprende un rasgo deseado para producir la progenie F1;

b) seleccionar una progenie F1 que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento y el rasgo deseado;

c) cruzar la descendencia F1 seleccionada con cualquier progenitor, para producir descendencia de retrocruce;

d) seleccionar la descendencia de retrocruce que comprende el rasgo deseado y/o los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento; y

e) repetir opcionalmente las etapas c) y d) una o más veces sucesivas para producir una cuarta descendencia de retrocruce o superior que comprenda el rasgo deseado y los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento. La invención incluye una planta de lechuga producida por este método.

De manera adecuada, la selección de plantas que comprenden los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento se realiza en la progenie F1 o en la descendencia de retrocruce. Según 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 que comprenden los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento puede iniciarse en la F3 o una generación posterior.

La planta que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento puede ser una planta de una línea endogámica, un híbrido, un haploide doble o de una población segregante.

Además, en la presente memoria se describe un método para la producción de una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento mediante el uso de una técnica de generación haploide duplicada para generar una línea haploide doble que comprende los dichos genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento.

Un método para producir semillas híbridas puede comprender cruzar una primera planta precursora con una segunda planta precursora y recolectar la semilla híbrida resultante, en donde dicha primera planta precursora y/o dicha segunda planta precursora es la planta reivindicada.

Un método para producir una planta de lechuga híbrida puede comprender cruzar una primera planta de lechuga precursora con una segunda planta de lechuga precursora y recolectar la semilla de lechuga híbrida resultante, en donde la primera planta de lechuga precursora y/o la segunda planta de lechuga precursora comprenden los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento.

Un método para producir una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento puede comprender el uso de una semilla que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento para cultivar la dicha planta de lechuga. Las semillas son, adecuadamente, semillas cuya muestra representativa se depositó en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41761.

Un método de producción de semillas puede comprender cultivar plantas de lechuga a partir de semillas, de las que se depositó una muestra representativa en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41761, permitiendo que las plantas produzcan semillas y cosechando esas semillas. La producción de las semillas se realiza adecuadamente mediante cruce o autopolinización.

También se describe en la presente memoria un método para la producción de una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento utilizando el cultivo de tejidos y un método para la producción de una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento utilizando la reproducción vegetativa.

Además, en la presente memoria se describe un método para la producción de una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento utilizando un método de modificación genética para introgresar los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento en la planta de lechuga. 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.

Además, en la presente memoria se describe un método de reproducción para el desarrollo de plantas de lechuga que comprenden los genes Rm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento en donde se utiliza el germoplasma que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento. La semilla representativa de dicha planta que comprende los genes R y que es representativa del germoplasma se depositó en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41761.

También se describe en la presente memoria un método para la producción de una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento en donde la progenie o el material de propagación de una planta que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento se utilizan como fuente para introgresar los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento en otra planta de lechuga. La semilla representativa de dicha planta que comprende los genes R se depositó en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41761.

Además, en la presente memoria se describe una planta de lechuga que muestra los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento, planta que se puede obtener mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

Además, en la presente memoria se describe una célula de una planta de lechuga (*Lactuca sativa*) donde dicha planta de lechuga comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento como están presentes en una planta de lechuga cultivada a partir de semillas de la que se depositó una muestra representativa en el NCIMB el 29 de septiembre de 2010 y con el número de registro 41761.

También se describe en la presente memoria una célula de una planta de lechuga (*Lactuca sativa*) donde dicha planta de lechuga comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento, planta de lechuga que se puede obtener cruzando una planta de lechuga con una planta de lechuga cultivada a partir de una semilla de la que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761, y seleccionando una planta de lechuga que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento, y que por lo tanto muestra resistencia a las razas BI:1, BI:4, BI:5, BI:6, BI:7, BI:10, BI:12, BI:13, BI:14, BI:15, BI:16, BI:17, BI:18, BI:21, BI:22, BI:23, BI:24, BI:25 y BI:28 de *Bremia lactucae*.

Además, en la presente memoria se describe el uso de semillas, una muestra representativa de las cuales tiene el número de registro NCIMB 41761, para transferir un gen R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento a otra planta de lechuga (*Lactuca sativa*).

Además, en la presente memoria se describe el uso de una planta de lechuga (*Lactuca sativa*) donde dicha planta de lechuga comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento como están presentes en una planta de lechuga cultivada a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761, como un cultivo.

La planta de lechuga (*Lactuca sativa*) que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento como están presentes en una planta de lechuga cultivada a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761, puede usarse como fuente de semillas.

Además, en la presente memoria se describe el uso de una planta de lechuga (*Lactuca sativa*) que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento como están presentes en una planta de lechuga cultivada a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761, como fuente de material de propagación.

También se describe en la presente memoria una planta de lechuga (*Lactuca sativa*) que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento como están presentes en una planta de lechuga cultivada a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761, para el consumo.

Se describe además en la presente memoria el uso de los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento, que están presentes en semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761, para conferir dichos genes R a una planta de lechuga (*Lactuca sativa*) que no tiene los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento.

Además, en la presente memoria se describe el uso de una planta de lechuga (*Lactuca sativa*) como donante de los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento como están presentes en semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761.

5 Material depositado

Las semillas que comprenden los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento se depositaron con número de registro en el depósito del NCIMB, NCIMB 41761, el 29 de septiembre de 2010 en NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, 15 Aberdeen, AB21 9YA Escocia, Reino Unido.

10 Información de marcadores

La **Tabla 4** enumera las secuencias de los marcadores vinculados a los genes R Dm3, Dm6 y R18. La **Tabla 5** enumera las secuencias de los cebadores que se usaron para amplificar los marcadores correspondientes de la **Tabla 4**.

La presente invención se explicará con más detalle en los ejemplos siguientes. Estos ejemplos tienen solamente fines ilustrativos, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera de esta invención.

20 Ejemplos

Ejemplo 1

Ensayo de siembra

Las semillas del lote de semillas 10G.913566 y las semillas de una planta de lechuga perteneciente a la variedad de lechuga arrepollada “Cobham Green” susceptible a las razas BI:1 a BI:28 de *Bremia lactucae* se hicieron germinar sobre papel de filtro humedecido en un recipiente cerrado para establecer un entorno de humedad relativamente alta. Después de que se establecieran plántulas, es decir, aparición de los cotiledones pero primera hoja aún no visible, se pulverizaron con una suspensión de esporas de las razas BI:16, BI:17 y BI:18 de *Bremia lactucae*. Estas razas se eligieron, debido a que la resistencia frente a cada una de estas razas está cubierta por solo uno de los genes R en fase de acoplamiento (véase la **Tabla 1**).

Las plántulas inoculadas se incubaron en condiciones controladas que eran de 15 °C con 16 horas de luz y 8 horas en régimen de oscuridad. Esta prueba de plántulas sigue más o menos el protocolo descrito por Bonnier y col. (New sources of major gene resistance in *Lactuca* to *Bremia lactucae*. Euphytica 61:3, 203-211 (1992)). Tras 8 días, se estableció claramente la infección en las plántulas susceptibles de las plantas “Cobham Green”, mientras que las plántulas cultivadas a partir del lote de semillas 10G.913566 no mostraron incidencias de esporulación en absoluto.

Ejemplo 2

A. Transferencia de genes R en fase de acoplamiento e identificación fenotípica mediante la prueba de plántulas

Una planta cultivada a partir de semillas del lote de semillas 10G.913566 (depositada con el número de registro NCIMB 41761), que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 de *Bremia* en fase de acoplamiento pero no otros genes R se cruzó con una planta de la variedad de lechuga arrepollada “Cobham Green” susceptible a las razas BI:1 a BI:28 de *Bremia lactucae* y, por lo tanto, no contiene genes R. Se hicieron germinar las semillas F1 y las plantas F1 resultantes se autofecundaron para obtener semillas F2.

Se realizaron pruebas de siembra como se describe en el **Ejemplo 1** en doce plántulas F2 resultantes de cada una de las cuatro plantas F1 autofecundadas (por ejemplo, 48 plántulas F2 en total), así como en cuatro plántulas de cada progenitor del cruce inicial. En las cuatro plántulas precursoras susceptibles de “Cobham Green”, y en aproximadamente 250 (4/12, 3/12, 4/12, 2/12) de las plántulas F2, se observó la esporulación del micelio de oomicetos en la superficie del cotiledón. Las 35 plantas F2 restantes (aproximadamente el 75 %) y todas las plantas precursoras resistentes del lote de semillas 10G.913566 no mostraron ninguna esporulación de la biomasa de oomicetos y se consideraron resistentes frente a BI:16, BI:17 y BI:18, y por lo tanto comprendían en su genoma los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento.

Esto demuestra además que los genes R cuando están en fase de acoplamiento, se heredan de manera monogénica dominante, ya que un análisis de la Chi cuadrado de la segregación observada muestra que no hay desviación en la F2 con respecto a la relación de segregación 3:1 esperada (Véase también la **Figura 1**).

B. Transferencia de genes R en fase de acoplamiento e identificación fenotípica mediante la prueba del disco de hoja

Se realizó otro cruce entre una planta de la variedad “Cobham Green” y una planta de la invención (número de registro al depósito NCIMB 41761). Se autofecundaron cuatro plantas F1 y de cada planta F1, se hicieron germinar doce semillas F2. Para confirmar la presencia de los genes R en fase de acoplamiento, se tomaron discos de hoja de las plantas F2 individuales en la etapa de 10 hojas. Se incubaron dos discos de hoja, por cepa y planta, en papel de filtro humedecido en un recipiente cerrado para establecer un entorno de alta humedad relativa. Estos discos de hoja se inocularon con suspensiones de esporas de las razas BI:16, BI:17 o BI:18 de *Bremia lactucae*. Los discos de hoja inoculados se incubaron en condiciones controladas de 15 °C con 16 horas de luz y 8 horas en régimen de oscuridad. Esta prueba del disco de hoja se basa en el protocolo descrito en Bonnier y col. (Euphytica, 61(3):203-211, 1992).

Después de 8, 11 y 14 días de incubación, el índice de enfermedad se calificó mediante inspección manual. El índice de enfermedad es una medida del nivel de infección, y discrimina entre las categorías R (resistencia) que significa sin infección evidente, RS (susceptible reducida), que significa una reducción significativa de la infección en comparación con un control susceptible, y S (susceptible) que significa una biomasa de oomicetos muy infectada y fuertemente esporulante.

Para cada fisio, se descubrió que 34 plantas (71 %) resultaron resistentes, mientras que 14 plantas de cada prueba resultaron susceptibles para las tres razas de *Bremia* (Tabla 2).

Además, los resultados del ensayo del disco de hoja mostraron que las 34 plantas resistentes eran resistentes para las tres razas BI:16, BI:17 y BI:18 de *Bremia* (Tabla 2). Por lo tanto, se puede concluir a partir de los resultados que los genes R del depósito y la descendencia resistente están presentes en la fase de acoplamiento (véase la Fig. 1).

Tabla 2

Resultados del ensayo de disco de hoja como se describe en el ejemplo 2b. Para cada planta de las cuatro poblaciones F2 se puntuó su resistencia (R) o susceptibilidad (S)															
Población F2 de la planta 1				Población F2 de la planta 2				Población F2 de la planta 3				Población F2 de la planta 4			
N.º Planta	BI. 16	BI. 17	BI. 18	BI. 18	BI. 16	BI. 17	BI. 18	BI. 18	BI. 16	BI. 17	BI. 18	BI. 18	BI. 16	BI. 17	BI. 18
1,01	R	R	R	2,01	R	R	R	3,01	R	R	R	4,01	S	S	S
1,02	R	R	R	2,02	S	S	S	3,02	R	R	R	4,02	S	S	S
1,03	R	R	R	2,03	R	R	R	3,03	R	R	R	4,03	R	R	R
1,04	R	R	R	2,04	R	R	R	3,04	S	S	S	4,04	S	S	S
1,05	R	R	R	2,05	R	R	R	3,05	R	R	R	4,05	R	R	R
1,06	R	R	R	2,06	S	S	S	3,06	S	S	S	4,06	R	R	R
1,07	S	S	S	2,07	R	R	R	3,07	R	R	R	4,07	R	R	R
1,08	S	S	S	2,08	R	R	R	3,08	R	R	R	4,08	R	R	R
1,09	R	R	R	2,09	R	R	R	3,09	S	S	S	4,09	R	R	R
1,10	R	R	R	2,10	R	R	R	3,10	R	R	R	4,10	R	R	R
1,11	R	R	R	2,11	R	R	R	3,11	R	R	R	4,11	R	R	R
1,12	S	S	S	2,12	S	S	S	3,12	S	S	S	4,12	S	S	S

Ejemplo 3

Identificación genotípica de los genes R en fase de acoplamiento.

Se extrajo el ADN y se purificó a partir de las 48 plantas F2 utilizadas en el ensayo del disco de hoja, usando protocolos estandarizados disponibles.

Los marcadores SCW09, CL922, SCV12, SCM05, LR0029, LK0036, LR0096, y SCI11 basados en la PCR (Tabla 4) se amplificaron usando los cebadores correspondientes mencionados en la Tabla 5. Para los marcadores SCW09, SCV12, SCM05 y SCI11, se llevaron a cabo las amplificaciones utilizando una enzima ADN polimerasa Tag estándar. Para los marcadores LR0029, LR0096, LK0036 y CL922 se utilizó durante la amplificación una Tag de arranque en caliente con actividad adicional de lectura de pruebas (por ejemplo, polimerasa Tag Plantinum®, Invitrogen). Se secuenciaron los productos de la PCR resultantes.

Los resultados de la secuencia se corresponden exactamente con los resultados de la prueba del disco de hoja. 34 plantas presentaron el haplotipo vinculado a Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento, lo que significa que

para cada una de las plantas resistentes secuenciadas se encontraron los fragmentos correspondientes desde la Id. de sec. n.º 1 hasta la Id de sec. n.º 8 (Véase la **Tabla 3**). Las 14 plantas susceptibles no mostraron este haplotipo.

Tabla 3

Datos de secuencia para el haplotipo del marcador basado en la PCR vinculado a los tres genes R en fase de acoplamiento para todas las plantas F2								
N.º Planta	Marcador SCW09	Marcador CL922	Marcador SCV12	Marcador SCM05	Marcador LR0029	Marcador LK0036	Marcador LR0096	Marcador SCI11
1,01	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
1,02	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
1,03	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
1,04	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
1,05	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
1,06	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
1,07	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
1,08	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
1,09	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
1,10	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
1,11	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
1,12	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
2,01	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
2,02	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
2,03	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
2,04	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
2,05	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
2,06	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
2,07	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
2,08	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
2,09	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
2,10	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
2,11	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
2,12	No	No	No	No	No	No	No	No

ES 2 972 475 T3

Datos de secuencia para el haplotipo del marcador basado en la PCR vinculado a los tres genes R en fase de acoplamiento para todas las plantas F2								
N.º Planta	Marcador SCW09	Marcador CL922	Marcador SCV12	Marcador SCM05	Marcador LR0029	Marcador LK0036	Marcador LR0096	Marcador SCI11
	encontrado	encontrado	encontrado	encontrado	encontrado	encontrado	encontrado	encontrado
3,01	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
3,02	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
3,03	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
3,04	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
3,05	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
3,06	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
3,07	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
3,08	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
3,09	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
3,10	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
3,11	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
3,12	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
4,01	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
4,02	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
4,03	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
4,04	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado
4,05	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
4,06	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
4,07	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
4,08	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
4,09	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
4,10	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
4,11	Id. de sec. n.º 1	Id. de sec. n.º 2	Id. de sec. n.º 3	Id. de sec. n.º 4	Id. de sec. n.º 5	Id. de sec. n.º 6	Id. de sec. n.º 7	Id. de sec. n.º 8
4,12	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado	No encontrado

Tabla 4

Marcadores vinculados a Dm3, Dm6 y R18 cuando están en fase de acoplamiento	
Nombre	Secuencia
SCW09 Id. de sec. n.º 1	AACAACGTAAATTTTCAAAGAAAATTTTCATTTAAAATCATAT AAATCCTCATGACACATTTTATTAAAATCTCATTTGCTCAATTC ACAAAACATAACTCCATGTTTTAGTAATTAAAAATCCAGGATCC TCATAACTCTTTCTCTGGTGTGTACAATCAACCGGTGCCGTCCT GCGATCCTGAGAACCTGAAACACATAACACATAACACGGTAAGC ACGAAGCTTAGTGAGTTCCCCAAGATACCACATAAAATACATAT TAGCCACTCGAGGCTATAACTCTATGGACCATCTGGTCCTAACT CTGTGGACCCCTCTGGTCCTAACTTTGTGGACCTTTTCGGTCCTAA TTCTGTAAACTCTGGAACACAAACACAACATAAATCACATAGAA ATAATGCAGTGCATCACATCACATAAATAGCATACAAAATACTC TGTCACATAACTCTGATTACCACTCTAGGTAAAGTATAGTGAGA AGACTCACTTGGAAGCTGAAAGCAGCTATCCTTACACTTGAAT CTTGAACCTCGCCACCGCCTAACACATAGGATGAACATCTCTTAT AATAACACTTTTTTCAGACTCAGATAATCGAAGGCGGCTCCTTC TCTTTCTAACTCTCTAAAGTGGGTAAAAGACCATTTTACCCTTC CAAGGCCTCTATTACTTATGTTGACCAAACCCCAAAGTCAACA AAAGTCAAGCTCAAGTCAACAGTCCACATTTGACCCTACTCGTC GAGTGCACCCATGCGACTCGTCGAGTCCCCTCGCATCAATTGAA CTCTACCTAGGACTCACTCAGATTGTGCGAGTTGACTCCCAACTC GGCGAGCCAACACTAGGTAAAGA
CL922 Id. de sec. n.º 2	GGCCTATTTGGTAGTTCTTGCACCACCACAACCACAGTTCATT CAAGGTGGAGGTTCTGGAGCAAATGCAGGAGGGTAAATATTTGG TTAAGGTAGTGATGGGTGTTAATTTTGTCTGGTAAATAA TGAAAAAAAAAATTAAAAAAATTCAATAATTTGTTTTGTAGGT GTCCATAGATTGCAACATGATTATGAGCAACATTAGTGCTACTT GAGTGGCAGGGGCTTTGATTTACCCTTGCAACCTATTTCGCATT CTAGAGGTACCATTGCAACATGTTTCATGTAAACATTAACTTTT GTCTAATTTACATATTCCGTCCCTGTACTTAGCACCATTTGTTT CAAGATGTTAACCTTTGTAAAACAAGGGGCAAATAGTCATTTCT AAGAATTTAAAAGCTTGAAACAGACTGTTAGGATCAAGACCAAA AGCATCATGGATAAAATAAATACCAAATTGTAAATGGTTTTTT TTTTTGACTTAAAGAAAAAAATTACCTAAGCAAAAGGACCAACA TGTAATTTTGTCTAGTAAGGGTGAGTTCAAACATAACCAAATT AGAGTAACTACTTTTAATTATTTGCGTTGTGTGGTTTTCTTAAT TATATAATTTAGAGTAACTACTTTTAACCTCATTCTAGTGCATA AATAAACCTGATGATACTTTTGTGATGCAGGTCAATACAAATCA ATGCTCACCAGAGAAGTTATCTTCCGATTTGCTTCTAGTGACAG GAGAAGTGGCACCCTTGGCTT

ES 2 972 475 T3

Marcadores vinculados a Dm3, Dm6 y R18 cuando están en fase de acoplamiento	
Nombre	Secuencia
SCV12 Id. de sec. n.º 3	ACCCCCCACTACCATATCAATCTCAGGTGCATTTTCATCATCAT CAAGCATGGAAAATGCAAGGCATAGCATAAATTCAACAACGATA TCTTATCGTCTTCAACACATTATTTCAGTGAGTTGAAATCCAAAA TCATCATGTAAGATGCGACTAACATAAAACATACACCCGATAAA TAGAAAAAAGGCAATGCTTACAACATATTGTCACAACCCAAAAC CAGACAACATGTCTCCAAAAGAAATTATACTTTTTGGGTATCAG ATAAGTGAAATCTTAAATTGAAGTGAAAAAGTTGCAGGACAAGT GGGGGGT
SCM05 Id. de sec. n.º 4	GGGAACGTGTTAATTAGAGATGTATTGTGCTATAGGGGGACTAC AGTTCGGCAGATCGGGTGATTAGCGATTTTCAGGTTTACGATTTA CCGAGACACACGAGGTGAGTCTTCTCACTATACTTTACCTTGAG TAGGTAACCAGAGTTATGTGATAGAGTACTTGTATGCTATGTAT GTCATGTGTTGTACTGCATTATTTCTATGTGATTTATGTGGTGC ATGTTTATCAGAGCTAGAACCTGAGGGTTCACAGAGTTTGGGTG CACGGACCCACAGAGTTATAGTCTAGAGTGGCTAATATGTGTTA TATGTGGTATTTTGGGGAACCTACTAAGCCTTGTGCTTACAGTG TTGATGTTATTGTTTCAGGTACTAGTGACGACCGCGGGAAGGCG CCGGCTTGATCCATACACACACACGTTCCC
LR0029 Id. de sec. n.º 5	GAGTGTGATGGTATTGAAGAAGTTGTTTCAAACAGAGATGATGA GGATGAAGA
LK0036 Id. de sec. n.º 6	GCAAAGGCTGAAAAAGGTTGTGAAAGAAAAGAAAATGTTTAATT TTATTGTTGAGGCGGTTGTAGGGGAAAAAACAGACCCCATTTGCT ATTCAATCAGCTGTGGCAGATTACCTAGGTATAGAGCTCAATGA AAAAATAAACCAGCAAGAAGTGAAGAAGCTTCGTAAATGGTTTG TGGACAATTCTGCTGGTAAGAAGATCCTAGTCATACTCGACGAT GTATGGCAGTTAGTTGACCTGA
LR0096 Id. de sec. n.º 7	AGACGATGTATGGCAACCAGTTGATTTGGAAGATATTGGTTTAA GTCGTTTTCCAAATCAAGATGTTGACTTCAAGGTCTTGATTACA TCACGGGACCAATCAGTTTGCCTGAGATGGGAGTTAAAGCTGA TTTAGTTCTCAAGGTGAGTGTCCTGGAGGAAGTGAAGCACACA GTTTGTTCTCCAATTTTTAGAACCTTCTGATGATGTCGATCCT GAGCTCAATAAAAATCGGAGAAGAAA

Marcadores vinculados a Dm3, Dm6 y R18 cuando están en fase de acoplamiento	
Nombre	Secuencia
SCI11 Id. de sec. n.º 8	ACTCCTTGACGAGTTACACGGAGCAACTATTTTTTCTAAGATAG ATCTCTGATCCGGCTACCACCAAATAAGAGTATCAGAAAAAGAC GTTTCATAAAACAGTGTTTCGCACATTCGACGACATTACGAGTTT CTCGTCATGCCATTTGGCCTCACAAACGCACCATCCACTTTTCA GTCCGCCATGAACGATCTCTTCAGACCCGCCCTTCAACGGTTTCG TGTTAGTCTTCTTGGATGACATCCTAGTCTTCAGTCCTTCCTTG GATACTCATTATGAACACTTACGACTTGTTTTTCAAAGCTTACG GGATCACCAATTTACACCAAACCATCCAAATGTATGTTTGCTA TGCATGAGGTCTCTTTGCTGGGACACAAAATTTTCATCAACTGGA GTAGTACCAGAAGCAGACAATATACAAGTAATGTAACAATGGCC ACAACCCACATCCTTCACAACCTTTAGCGCTTACTTAGGATTGA CGGGATATTACCGTCGATTTGTTCCCTCTACGCCAAAATTGCA GCACCTTTAACTAATATTCTTAAACTCAAATCTTTTTCGTGGAA TAACTCAGCATAGGAGGCGTTTGAACAACCTTAAGACAACCATGC AAGACTTGGTGACGTTAGCCCTACCAGACTTCAACTCTCAATTT GATGTAAACATAGATGCTTCAGGAATGGCAATTGGAGTACTGTT ATCTCAAAACAACAGACCAATATCCTTTTTTATGTAACACCGGA AATTTTCAAACAAATTTTTCATTTTAAATCATATAATTCTCGT AACACATTTACAAAAATCTCACTGATTTAATTTACAAAACACA ACTTCATAATTGTTTTGATTCTACTCCAGGATCCTCAAACAT AACTCTTGTTCTGGTGTGTACAATCAAGCCGGTGCCTTCCCGCG ATCCTGAGAAAACCTGAAACACATATCACATAACACGGTAAGCA CGAAGTTTAGTGAGTTCCCCAAAATACCACATACAACAAATTAG CCACTCGAGGCTATAACTCTGTAAGACCCTCCGGTCAATGTGTC TCAGTCAGACCCTCCAGTCCCACAACCTCTGATGGACCCTCTGGT CCTAACTCTGTGACCC

Tabla 5

Cebadores para su uso en la detección de los marcadores de la Tabla 4	
Cebador directo SCW09 Id. de sec. n.º 9	GTGACCGAGTGTAACAACGTAAAT
Cebador inverso SCW09 Id. de sec. n.º 10	GTGACCGAGTAGTCTTAACCTAGT
Cebador directo CL922 Id. de sec. n.º 11	ATGCGGGTCAACAACAATA
Cebador inverso CL922 Id. de sec. n.º 12	TGCCACTTCTCCTGTCACTA
Cebador directo SCV12 Id. de sec. n.º 13	ACCCCCACTACCATATCAATCTC
Cebador inverso SCV12 Id. de sec. n.º 14	ACCCCCACTTGTCTGCAACTTT
Cebador directo SCM05 Id. de sec. n.º 15	GGGAACGTGTTAATTAGAGATGTA
Cebador inverso SCM05 Id. de sec. n.º 16	GGGAACGTGTGTGTGTATGGATCA
Cebador directo LR0029 Id. de sec. n.º 17	GGAAGTGCAGCAACTGGAAT
Cebador inverso LR0029 Id. de sec. n.º 18	AGGGAACAAAGTGGTGGTTG
Cebador directo LK0036 Id. de sec. n.º 19	GCAAAGGCTGAAAAAGGTTG

Cebadores para su uso en la detección de los marcadores de la Tabla 4	
Cebador inverso LK0036 Id. de sec. n.º 20	TCAGGTCAACTAACTGCCATACA
Cebador directo LR0096 Id. de sec. n.º 21	AGACGATGTATGGCAACCAG
Cebador inverso LR0096 Id. de sec. n.º 22	TTTCTTCTCCGATTTTATTGAGC
Cebador directo SCI11 Id. de sec. n.º 23	ACATGCCGTGTATTACTCAGAGTT
Cebador inverso SCI11 Id. de sec. n.º 24	ACATGCCGTGACAGTATGAGACCG

REIVINDICACIONES

1. Una planta de lechuga resistente a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae*, planta que comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento que transmiten resistencia a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae* y no a las razas Bl:20, Bl:26, y Bl:27 de *Bremia lactucae*, y cuyos genes R se pueden obtener por introgresión de una planta cultivada a partir de semillas de las que una muestra representativa se depositó con el número de registro NCIMB 41761, y en donde los dichos genes R en las semillas de la semilla con número de registro NCIMB 41761 están al menos vinculados al marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4, al marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5 y al marcador LK0036 con la Id. de sec. n.º 6, y opcionalmente también a uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en el marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1, el marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, el marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3, el marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7, y el marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.
2. Una planta de lechuga según la reivindicación 1, planta que se puede obtener cruzando una planta de lechuga cultivada a partir de semillas de las que se depositó una muestra representativa con el número de registro NCIMB 41761, y seleccionando en la progenie F2 del cruce que se obtiene tras cruzar F1 consigo misma o con otra planta para obtener plantas que muestran resistencia frente a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae*.
3. Una planta de lechuga según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que es también resistente al pulgón de la raíz (*Pemphigus bursarius*).
4. Progenie de una planta de lechuga según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la planta de progenie comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento que transmiten resistencia a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae*.
5. Semilla de una planta de lechuga según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la planta que puede crecer a partir de la semilla comprende los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento que transmiten resistencia a las razas Bl:1, Bl:2, Bl:4, Bl:5, Bl:6, Bl:7, Bl:10, Bl:12, Bl:13, Bl:14, Bl:15, Bl:16, Bl:17, Bl:18, Bl:21, Bl:22, Bl:23, Bl:24, Bl:25 y Bl:28 de *Bremia lactucae*.
6. Material de propagación capaz de crecer hasta convertirse en una planta según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. Material de propagación según la reivindicación 6, en donde el material de propagación se selecciona del grupo que consiste en microsporas, polen, ovarios, óvulos, embriones, sacos embrionarios, óvulos, esquejes, raíces, puntas de raíces, hipocótilos, cotiledones, tallos, hojas, flores, anteras, semillas, células meristemáticas, protoplastos y células.
8. Cultivo tisular de material de propagación según la reivindicación 6 o 7.
9. Uso de los marcadores que se definen en la reivindicación 1 para identificar plantas que contienen los genes Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento que transmiten resistencia a *Bremia lactucae*.
10. Uso de los marcadores según la reivindicación 1 para desarrollar otros marcadores vinculados a los genes Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento que transmiten resistencia a *Bremia lactucae*.
11. Un proceso para identificar plantas de lechuga que comprenden los genes R Dm3, Dm6 y R18 en fase de acoplamiento, que comprende la etapa de seleccionar dichas plantas de lechuga entre una población de plantas de lechuga segregadas para estos genes en fase de acoplamiento usando el marcador SCM05 con la Id. de sec. n.º 4, y el marcador LR0029 con la Id. de sec. n.º 5, y el marcador LK0036 con la Id. de sec. n.º 6, y opcionalmente también a uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en el marcador SCW09 con la Id. de sec. n.º 1 y el marcador CL922 con la Id. de sec. n.º 2, y el marcador SCV12 con la Id. de sec. n.º 3 y el marcador LR0096 con la Id. de sec. n.º 7 y al marcador SCI11 con la Id. de sec. n.º 8.

Figura 1

Heterocigoto en fase de acoplamiento:

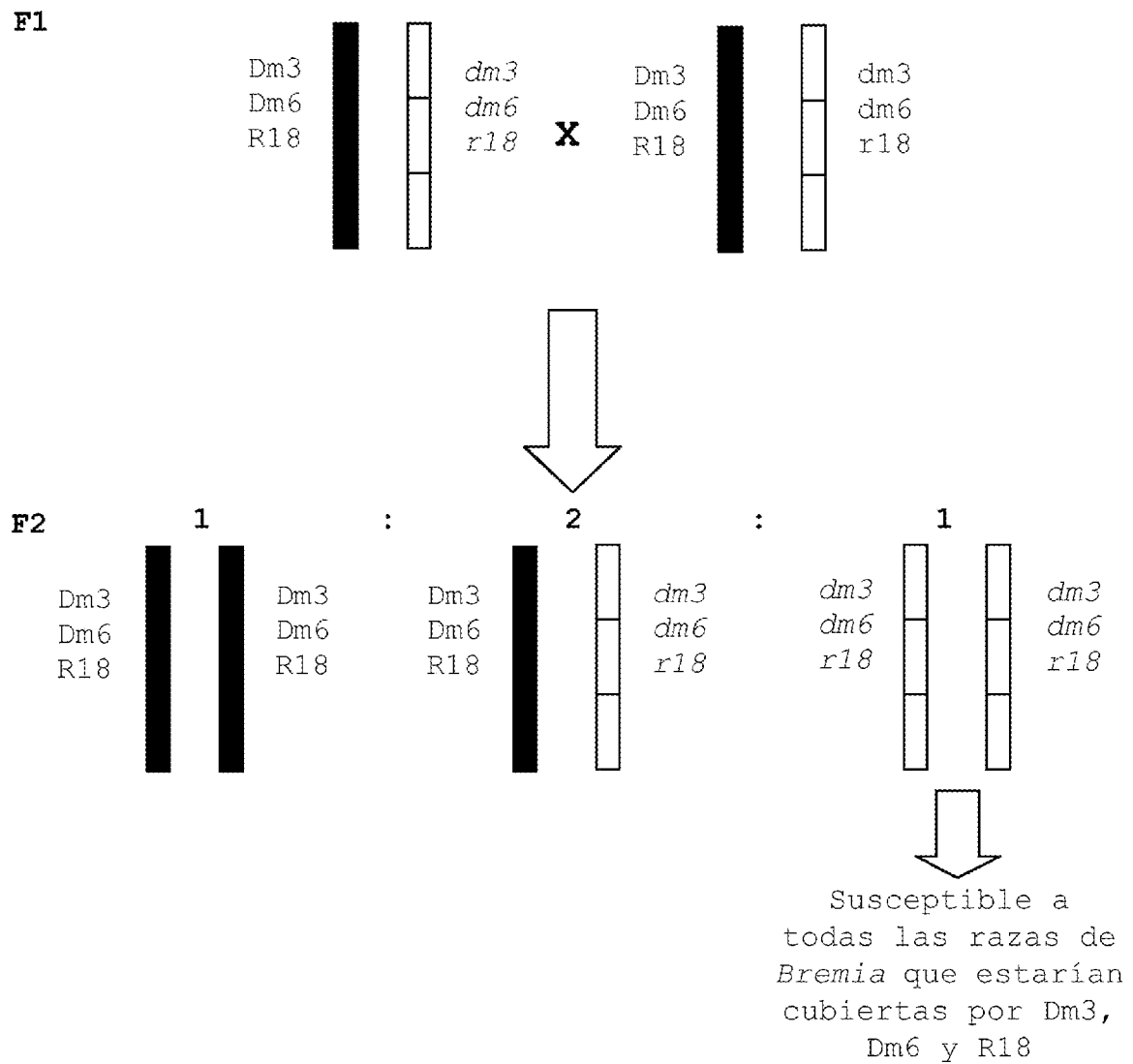


Figura 2

Heterocigoto en fase de repulsión:

