



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 210 528**

51 Int. Cl.:
A01H 5/12 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **97924387 .0**
86 Fecha de presentación : **04.06.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0921720**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.1999**

54 Título: **Plantas de la familia compositae resistentes a los áfidos.**

30 Prioridad: **04.06.1996 NL 1003261**
12.11.1996 US 748212

73 Titular/es: **Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V.**
Burgemeester Crezeelaan 40
2678 KX De Lier, NL

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.07.2004**

72 Inventor/es: **Jansen, Johannes, Petrus, Antonius**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.12.2007**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.12.2007**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 210 528 T5

DESCRIPCIÓN

Plantas de la familia compositae resistentes a los áfidos.

5 La presente invención se refiere a nuevas plantas de lechuga del género *Lactuca* que son resistentes al áfido *Nasonovia ribisnigri* y que muestran en la presente invención caracteres agronómicamente deseables.

10 Los áfidos causan mucho daño a los cultivos de vegetales. Se alimentan de los floemas de las plantas y por lo tanto causan un crecimiento reducido o anormal. Los áfidos vivos o los restos de áfidos hacen que el producto recolectado sea invendible. Además, la melaza, un líquido azucarado secretado por los áfidos, forma una capa pegajosa sobre las hojas. Se teme grandemente a los áfidos, no sólo por su daño directo, sino también porque propagan enfermedades víricas.

15 *Nasonovia ribisnigri* es la especie de áfido que en Europa se encuentra más frecuentemente en las lechugas cultivadas en el campo. *N. ribisnigri* es particularmente dañino porque prefiere alimentarse de las hojas jóvenes de la planta. Los áfidos por lo tanto quedan atrapados fácilmente en las cabezas que se cierran de las lechugas, haciendo difícil que sean alcanzados por los pesticidas. Especialmente en las lechugas de tipo cabeza crujiente (*crisphead*), que forman una cabeza compacta, esto causa grandes problemas. Los agricultores limitan el daño causado por los áfidos pulverizando pesticidas repetidamente sobre los cultivos en crecimiento, en particular cuando las condiciones meteorológicas son favorables para la reproducción de los áfidos. El uso de cantidades excesivas de pesticida es indeseable desde un punto de vista medioambiental. Además, los pesticidas yerran su objetivo en casos particulares, como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, en el caso de las cabezas que se cierran de las lechugas.

25 La resistencia de las plantas sobre las que actúan los áfidos (resistencia de la planta anfitriona) es una alternativa respetuosa para el medio ambiente al uso de pesticidas para controlar el desarrollo de áfidos en, por ejemplo, lechugas. Por lo tanto, se ha realizado ya una extensa investigación sobre la resistencia a *N. ribisnigri* y sobre la herencia de este tipo de resistencia. Se describió una resistencia parcial a *N. ribisnigri* para algunas variedades cultivadas de lechuga (Dunn, J.A. y Kempton, D.P.H. (1980) Tests of Agrochemical and Cultivars, N° 1, (Ann, appl. Biol. 94, Supplement): 58-59). Se encontró una resistencia casi completa a *N. ribisnigri* en la variedad de *Lactuca silvestre* *L. virosa* L. (Eenink A.H. y F.L. Dieleman (1983) Euphytica 32:691-695). Se encontró que esta resistencia a *Nasonovia* en *L. virosa* era causada por un único gen dominante, denominado gen *Nr*.

35 En 1981, el antiguo *Institute for Horticultural Plant Breeding* (IVT, ahora parte del CPRO-DLO) de Wageningen liberó plantas de *L. sativa* que contenían en su genoma un fragmento de cromosoma de *L. virosa* que tenía el gen *Nr* para resistencia a *N. ribisnigri*. Estas plantas resultaron de un programa de hibridación con *L. virosa* y *L. sativa*, en el que se usó *L. serriola* como especie puente. Se usa una especie puente cuando dos especies pueden cruzarse la una con la otra solamente en un grado limitado, como fue el caso de *L. virosa* y *L. sativa*.

40 Las plantas liberadas eran de un tipo indeseable con respecto al fenotipo y los caracteres agronómicos (de hojas sueltas, malas características de cultivo).

Debido a los caracteres agronómicos indeseables, estas plantas se usaron por compañías de reproducción como parentales de hibridación con el propósito de obtener plantas mediante recombinación y selección genéticas, que combinaran resistencia a *N. ribisnigri* con buenos caracteres agronómicos.

45 *L. sativa* es una especie anual pero, cuando se cultiva bajo luz artificial a una temperatura aumentada, pueden producirse 2-5 generaciones sucesivas en un año. Los procedimientos de retrocruzamiento son métodos conocidos y adecuados para cruzar genes a partir de un "parental donante" en una base genética con un alto valor agronómico. En general, la introgresión de un gen dominante en un fenotipo agronómicamente aceptable puede lograrse mediante 3-5 retrocruzamientos, seguido de 2-3 autopolinizaciones. Por lo tanto, se requieren 5-8 generaciones en 3-5 años para obtener plantas agronómicamente aceptables que tengan en su genoma el gen deseado. Sin embargo, aunque en 1981 ya se liberaron para compañías de semillas plantas que tenían en gen *Nr* en 1981, no se ha informado hasta ahora todavía de la transferencia exitosa del gen *Nr* a plantas de lechuga agronómicamente aceptables.

55 Es ahora el objeto de la presente invención proporcionar nuevas plantas de lechuga, que combinan resistencia a los áfidos de la especie *Nasonovia ribisnigri* con buenos caracteres agronómicos.

60 Este objeto se logra conforme a la invención, por cuanto se encontró en el curso de un programa de selección que la aplicación de esta resistencia en plantas de lechuga que tenían buenas características agronómicas fue impedida por los efectos secundarios negativos causados por el fragmento de cromosoma de *L. virosa*, en el que estaba situado el gen *Nr*, cuando se insertó en un genoma de *L. sativa*. Comparadas con plantas cultivadas de lechuga sin la resistencia a *N. ribisnigri*, las plantas que eran homocigóticas respecto al gen *Nr* mostraron de hecho un crecimiento reducido, un color verde más claro y una degradación acelerada de la clorofila en las hojas más antiguas de la planta generativa (cuando la planta está floreciendo). Esto dio como resultado plantas generativas que tenían completa o parcialmente blancas las hojas más antiguas y/o una altura de la planta reducida. Este fenotipo agronómicamente no deseado se designará adicionalmente en esta solicitud como "fenotipo CER", que significa "crecimiento Compacto y Envejecimiento Rápido". La figura 1 proporciona un ejemplo de la diferencia entre plantas normales de lechuga y plantas con CER. En la etapa

ES 2 210 528 T5

vegetativa los síntomas de CER son particularmente evidentes cuando las plantas crecen bajo tensión (por ejemplo, a baja temperatura).

5 La invención proporciona por lo tanto plantas que tienen el gen de resistencia *Nr* en el genoma, en las que la información genética responsable del fenotipo CER está ausente del genoma de la planta al menos hasta tal grado que en presencia del gen *Nr* en condición homocigótica el fenotipo CER no se expresa.

10 La presente invención está basada en la revelación que el fenotipo CER no es un resultado del propio gen *Nr*, sino más bien de la información genética de la proximidad del gen de resistencia. Conforme a la invención, se ha encontrado por lo tanto que hay una conexión entre la resistencia y el fenotipo CER. Rompiendo esta conexión, es posible cultivar plantas resistentes y agronómicamente aceptables. Se ha encontrado por otra parte en la bibliografía y en la propia investigación que otros caracteres de *L. virosa* están a menudo asociados con el fenotipo CER cuando están cruzados en otras plantas. Maxon Smith y Langton (The Grower, 21/9/1989 p 54-55) describen una conexión entre el crecimiento compacto y resistencia a *Bremia lactucae*, introgresada a partir de *L. virosa* en lechugas cultivadas.
15 La presente invención proporciona también una solución para esto, ahora que se ha encontrado que el fenotipo CER está ligado genéticamente al carácter deseado. El fenotipo CER es un carácter recesivo que se expresa solamente en plantas con resistencia homocigótica.

20 Una vez que se hubo obtenido esta revelación, fue posible seleccionar plantas en las que la información genética para el fenotipo CER estaba retirada de la proximidad del gen *Nr* o cambiada hasta un grado tal que la resistencia ya no estaba expresada en combinación con el fenotipo CER. El gen de resistencia *Nr* está descrito en esta solicitud a modo de ejemplo, pero el principio de la invención también se aplica, desde luego, a otros caracteres ligados a CER que se tienen su origen en *L. virosa*.

25 La retirada o cambio de la información genética que da como resultado el fenotipo CER es causada mediante evento(s) de recombinación en la proximidad del gen. En este momento no está completamente claro si la información del CER está situada hacia la izquierda o hacia la derecha del gen, o alrededor de él. Cuando la información genética para el fenotipo CER está situada en ambos lados del gen de resistencia, se cambian o retiran preferiblemente ambas partes de esta información genética. Conforme a esta invención, preferiblemente al final se seleccionarán plantas en las que se han verificado dos o más eventos de recombinación. Tal doble evento de recombinación no necesita desde luego haberse verificado en una generación, sino que los eventos de recombinación de generaciones sucesivas pueden dar también como resultado la retirada o cambio final de la información genética en ambos lados del gen de resistencia. Si la información de CER está situada solamente en un lado del gen, es desde luego suficiente un único evento de recombinación.
30

35 En esta solicitud, se entiende que un "evento de recombinación" significa un entrecruzamiento meiótico.

Las plantas sin fenotipo CER pueden obtenerse por medio de técnicas convencionales de hibridación. Una condición es, sin embargo, que se use el criterio correcto de selección. Conforme a la invención, se ha definido ahora un criterio adecuado de selección, es decir, la completa o parcial ausencia o inactividad de un fragmento de información genética de la proximidad del gen de resistencia. Conforme a la invención, no es relevante qué cantidad de la información genética que rodea al gen de resistencia está ausente de un producto recombinante o de qué manera el gen CER o los genes CER esté o estén desactivados, con tal que el fenotipo CER esté ausente de la planta y su progenie.

45 Para encontrar plantas en las que se haya verificado la recombinación entre el gen *Nr* y genes que causan el fenotipo CER, en la práctica se escrutan poblaciones segregantes, o progenies de tales poblaciones, en busca de plantas que tengan un fenotipo recombinante, es decir, resistencia homocigótica a *N. ribisnigri* en combinación con un fenotipo no CER. Aunque es posible encontrar de esta manera productos recombinantes adecuados, como puede verse en los ejemplos, hay sin embargo varias razones por las que puede complicarse encontrar productos recombinantes agronómicamente valiosos.
50

En el programa de selección para combinar resistencia con buenas características agronómicas, se ha encontrado que las plantas que combinan resistencia a *N. ribisnigri* con un fenotipo agronómicamente valioso son casi siempre no el resultado de recombinación en un cromosoma, sino que son heterocigóticas respecto al fragmento de cromosoma de *L. virosa* introgresado. Conforme a la invención, se ha encontrado que el fenotipo CER se hereda recesivamente. Debido a que el gen *Nr* es dominante, una planta con una única copia del fragmento de cromosoma de *L. virosa* combinará resistencia con un fenotipo normal (no CER). La progenie de tales plantas segregará sin embargo para el fenotipo CER y no pueden usarse comercialmente, porque las variedades de lechuga comerciales son líneas puras que deben ajustarse a requisitos estrictos de uniformidad genética para ponerse en circulación. Se ha encontrado además que, debido a que la expresión de la resistencia es una característica biológica que depende de diferentes condiciones ambientales y experimentales, una cierta fracción de las plantas, en un ensayo de resistencia a *N. ribisnigri*, es a menudo clasificada incorrectamente. Plantas con el gen *Nr* se consideran sensibles y plantas sin el gen *Nr* se puntúan como resistentes. Lo mismo se aplica cuando se puntúa el fenotipo CER de plantas individuales en el campo o en el invernadero. Dependiendo de las condiciones experimentales y ambientales, una cierta fracción de las plantas con el fragmento de cromosoma de *L. virosa* insertado se considerarán normales en estado homocigótico, mientras que varias plantas en las que el fragmento de cromosoma insertado está presente en estado heterocigótico o está totalmente ausente, podrían mostrar síntomas que den como resultado una clasificación errónea del fenotipo CER.
55
60
65

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

Por lo tanto, puede ser más eficaz usar herramientas de biología molecular en la selección de plantas adecuadas. Una técnica excepcionalmente útil es la técnica AFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados), como se describe por Vos, P. *et al.*, en *Nucleic Acids Research*, 1995, Vol. 23, N° 21: 4407-4414. Cuando se aplica a la presente invención, esta técnica está basada en cartografiar marcadores de ADN que están ligados genéticamente al gen *Nr*, después de lo cual se puede determinar de una manera relativamente sencilla si se ha producido un evento de recombinación en la proximidad del gen *Nr*, en una progenie de un experimento de hibridación. Cuando un marcador ligado se pierde, se ha verificado (por lo tanto) un entrecruzamiento entre el gen *Nr* y ese marcador. Eligiendo marcadores a diversas distancias del gen puede determinarse también si ha desaparecido mucho o poco de la proximidad del gen. La progenie en la que están ausentes uno o más de los marcadores ligados carece por lo tanto de al menos un fragmento de la proximidad no deseada del gen, y tiene por lo tanto una probabilidad superior al promedio de que un cromosoma con el gen *Nr* esté presente, en el que la información genética que produce el fenotipo CER esté ausente. La eficacia de la selección de plantas que combinan que sean homocigóticas respecto al gen *Nr* con ausencia del fenotipo CER puede aumentarse significativamente con marcadores moleculares.

La cartografía de marcadores genéticos en la proximidad de un gen es un procedimiento que puede llevarse a cabo bastante fácilmente por los biólogos moleculares de habilidad media, y que está descrito, por ejemplo, por Lefebvre, V. y A.M. Chevre, en *Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review*. *Agronomie* 15, 1995 (1): 3-19; por Michelmore, R.W. en *Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes*. *Annual Review of Phytopathology* 33 (1995): 393-427; por Michelmore, R.W., R.V. Kesseli y E.J. Ryder, *Genetic mapping in lettuce*. En: R.L. Phillips & I.K. Vasil (eds.) *DNA-based markers in plants*, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, 1994, pp. 223-239; por Winter, P. y G. Kahl en *Molecular marker technologies for plant improvement*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1995, 11 (4): 438-448. Se puede encontrar información general sobre la tecnología AFLP en Vos, P. *et al.* (*supra*). En el ejemplo 2, se elucidará con más detalle el uso de la tecnología AFLP para seleccionar plantas conforme a la invención.

La presente invención se ilustra en esta solicitud con referencia a la lechuga cultivada *Lactuca sativa*.

Conforme a la presente invención, el gen de resistencia tiene su origen preferiblemente en *L. virosa*. Las plantas conforme a la invención son, desde luego, de manera sustancial completamente fértiles y homocigóticas respecto al gen de resistencia. Debido a la ausencia de la base genética que produce el fenotipo CER, muestran sustancialmente un crecimiento no reducido, coloración verde de las hojas no reducida y una degradación de la clorofila no prematura cuando las plantas están en la fase generativa.

Se entiende que las expresiones "lechuga cultivada" o "plantas de lechuga cultivadas" significan lechuga que es adecuada para el consumo y cumple con los requisitos para el cultivo comercial. Además de las propias plantas de lechuga, y sus partes adecuadas para el consumo, tales como las cabezas u hojas, la invención comprende partes o derivados de la planta adecuados para propagación. Ejemplos de partes adecuadas para propagación son tejidos orgánicos, tales como hojas, tallos, raíces, vástagos y similares, protoplastos, embriones somáticos, anteras, pecíolos, células en cultivo y similares. Los derivados adecuados para propagación son, por ejemplo, las semillas. Las plantas conforme a la invención pueden cultivarse o propagarse de la manera convencional, pero también por medio de técnicas de cultivo de tejidos de partes de la planta.

Las plantas conforme a la invención, que se caracterizan por la ausencia de un fenotipo CER en presencia del gen *Nr* en estado homocigótico, pueden usarse para transferir la resistencia a *N. ribisnigri* a otros tipos de lechuga agrónomicamente valiosos. Esto se verifica, por ejemplo, por medio de procedimientos normales de retrocruzamiento en busca de un gen dominante (véase Briggs, F.N. y P.F. Knowles (1967) en: *Principles of plant breeding*, pp. 162-167), seguido de autopolinización de las plantas durante al menos dos generaciones y la selección de líneas que sean homocigóticas respecto al gen de resistencia.

En etapas particulares del programa de selección, se usan polinizaciones cruzadas. Sin embargo, la polinización cruzada de plantas autopolinizantes requiere que se impida la autofertilización en la planta que se usa como el parental femenino. Esto puede lograrse retirando manualmente las partes masculinas de los órganos reproductores. Esto puede llevarse a cabo mediante su retirada física o por medio de agentes químicos y/o el uso de agua sobre las flores. Todos estos métodos de retirar o convertir en disfuncionales las partes masculinas de los órganos reproductores son bien conocidos en la técnica. La progenie de una hibridación puede conseguirse provocando que el parental femenino de la hibridación produzca semillas, recogiendo la semilla F1 o de retrocruzamiento y sembrándola para obtener nuevas plantas. Las plantas F1 pueden autopolinizarse para producir la generación F2 o retrocruzarse con el parental recurrente de un esquema de retrocruzamiento. Las plantas retrocruzadas pueden retrocruzarse adicionalmente con el parental recurrente para mejorar el valor agronómico de las plantas en una generación posterior o pueden autopolinizarse para producir plantas que sean homocigóticas respecto al gen *Nr*.

En una primera realización específica, la invención proporciona plantas de *L. sativa* L. de la línea RZ 96.85123, cuya obtención se explica con más detalle en el ejemplo 2. Las plantas de esta línea son homocigóticas respecto al

gen *Nr* y carecen de la información genética que causa el fenotipo CER. Tales plantas no son pequeñas y/o no son amarillas, como las plantas con CER. Cuando las plantas no son pequeñas y/o no son amarillas, se ha perdido bastante de la información genética que causa el fenotipo CER, o esta información genética está suficientemente desactivada. Para ilustrar la invención, se depositaron semillas de las plantas RZ 96.85123 en las *National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria* (NCIMB) con el número 40804, el 16 de mayo de 1996. Se impuso la condición que hasta la fecha de concesión de una patente, solamente se pudieran expedir muestras de las semillas depositadas a una persona experta.

En otra realización específica, la invención proporciona el resultado del método de hibridación convencional, y el esquema específico de selección como se describe en el ejemplo 1, en forma de plantas de la línea RZ 96.75906. Estas plantas son igualmente homocigóticas respecto al gen *Nr* y carecen de la información genética que causa el fenotipo CER. Para ilustrar la invención, se depositaron semillas de las plantas RZ 96.75906 en las NCIMB con el número 40803, el 16 de mayo de 1996.

Un método para obtener plantas conforme a la invención comprende seleccionar una planta parental que sea heterocigótica respecto a la resistencia *Nr*, fabricar una población segregante, producir una progenie de sustancialmente cada planta de la población segregante, y examinar la progenie en busca de resistencia y del fenotipo CER. Una población segregante puede ser producida de diferentes maneras, tales como mediante autopolinización de la planta parental heterocigótica, mediante cruzamiento de la planta parental heterocigótica con una planta resistente y mediante la aplicación de una técnica de dobles haploides a la planta parental heterocigótica. En la técnica de dobles haploides, se cultivan nuevas plantas a partir de gametos dobles de una planta. Los gametos pueden tener su origen en los órganos reproductores masculinos (androgénesis) o en los órganos reproductores femeninos (ginogénesis). El cultivo de dobles haploides requiere usualmente una etapa *in vitro*. La ventaja de los dobles haploides en la búsqueda de productos recombinantes es que los gametos a partir de los que tienen su origen las plantas resultan de una recombinación meiótica en la planta parental heterocigótica, mientras que los dobles haploides resultantes son completamente homocigóticos, de modo que se evitan los efectos enmascaradores de la heterocigosis.

En plantas obtenidas por medio de la técnica de dobles haploides, puede reconocerse inmediatamente el producto recombinante deseado: una planta con resistencia y sin CER. En las líneas obtenidas mediante autopolinización de plantas de una población segregante, pueden reconocerse las líneas que tienen las plantas recombinantes deseadas por cuanto la línea es uniformemente resistente pero todavía segrega para CER, o por cuanto la línea todavía segrega para la resistencia pero tiene uniformemente un fenotipo normal, o por cuanto la línea es uniformemente resistente y tiene uniformemente un fenotipo normal.

La eficacia de dicho método puede aumentarse significativamente cuando, antes de producir una progenie de sustancialmente cada planta, se verifica un preensayo sobre plantas en las que se ha producido un evento deseado de recombinación. Tal preensayo puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando métodos de biología molecular, tales como la técnica AFLP. La selección conforme a la técnica AFLP está basada en detectar eventos de recombinación en la proximidad del locus del gen *Nr* en el genoma de plantas de la población segregante.

La presente invención se elucidará con más detalle con referencia a los ejemplos adjuntos, que se dan solamente a modo de ilustración, y no se pretende que limiten la invención de ningún modo.

Ejemplos

General

Las técnicas usadas para obtener las plantas conforme a la invención están descritas muy generalmente a continuación. Los detalles específicos de los experimentos llevados a cabo se examinarán con más detalle en los ejemplos.

Materiales y método

1. Ensayo de resistencia

La resistencia a *N. ribisnigri* puede demostrarse cultivando una población de plantas e inoculando cada planta con un cierto número de áfidos *N. ribisnigri* (por ejemplo, 15). La resistencia se demuestra cuando después de un cierto periodo de ensayo (por ejemplo, 7 días) el número de áfidos sobre la planta es 0 o inferior al número original, mientras que sobre las plantas sensibles el número de áfidos por planta ha aumentado después del periodo de ensayo.

Las plantas de una variedad sensible se incluyen en el ensayo como testigos. Los áfidos deben multiplicarse claramente sobre estas plantas testigo para que el ensayo sea aceptado como fiable. El ensayo se lleva preferiblemente a cabo a una temperatura entre 18 y 24°C, y a una duración mínima del día de 14 horas. Se usan preferiblemente plantas pequeñas en la fase vegetativa con aproximadamente de 1 a 3 hojas verdaderas, para inoculación con individuos de *N. ribisnigri*, aunque también pueden usarse plantas más viejas en el ensayo de resistencia. La resistencia a *N. ribisnigri* no se observa solamente bajo las condiciones de ensayo, sino que puede verse igualmente en el campo o en el invernadero.

ES 2 210 528 T5

Los áfidos usados en el ensayo de resistencia fueron de un biotipo rojo designado como WN1 y pueden obtenerse en el departamento de entomología de la Agricultural University de Wageningen. Antes del ensayo, se hicieron crecer sobre plantas de lechuga. También pueden usarse, desde luego, áfidos de color verde. Los ensayos de resistencia se llevaron a cabo con semillas que se sembraron en bloques de abono puestos en tiestos. Los áfidos se transfirieron a las plantas jóvenes de lechuga cuatro semanas después de la siembra.

2. Hibridaciones

Para la primera hibridación, se usa un parental que es homocigótico respecto a la resistencia a *N. ribisnigri* y que muestra los caracteres agrónomicamente indeseables de un crecimiento reducido, una coloración verde reducida y/o una degradación temprana de la clorofila en la fase generativa. La otra planta es una planta que no es resistente a *N. ribisnigri* y que no muestra los caracteres agrónomicamente indeseables indicados anteriormente.

Las plantas F1 obtenidas mediante hibridación pueden retrocruzarse con el parental recurrente (sensible a *N. ribisnigri*) (u otra planta sensible a *N. ribisnigri*), y/o pueden cultivarse hasta la generación F2 mediante autopolinización. Las plantas así resultantes BC1 (retrocruzadas) o F2 pueden igualmente cultivarse hasta la siguiente generación por medio de autopolinización o pueden usarse de nuevo como parental de hibridación. Detectar plantas con un evento de recombinación cercano al locus del gen *Nr* que proporciona resistencia, usando la técnica AFLP u otra técnica de marcadores moleculares, puede verificarse eficazmente en una población que segrega para el gen *Nr*. Ésta puede ser una población obtenida mediante autopolinización de una planta heterocigótica (véase el ejemplo 2), o una población obtenida mediante retrocruzamiento de una planta heterocigótica, preferiblemente con una planta de la línea parental resistente. La selección fenotípica para recombinación entre resistencia a *N. ribisnigri* y fenotipo CER puede verificarse eficazmente con una población de líneas consanguíneas de plantas de una población que segrega para el gen *Nr*.

Se entiende en la presente invención que una línea significa un grupo de semillas o plantas obtenidas mediante autopolinización de una única planta.

El aumento de la eficacia de la selección a través del uso de marcadores moleculares se logra por cuanto puede llevarse a cabo una preselección con marcadores. Solamente la progenie de plantas en la que se ha demostrado, usando marcadores, que se ha verificado un evento de recombinación en la proximidad del locus *Nr* se ensayan posteriormente más a fondo en busca de resistencia y de la presencia del fenotipo CER.

Puede encontrarse rotura de la conexión entre resistencia y el fenotipo CER en una población de líneas (estén o no preseleccionadas con marcadores) ensayando varias plantas por línea (por ejemplo, 25) en busca de resistencia a *N. ribisnigri*, y ensayando la misma planta o plantas diferentes (por ejemplo, 25), en busca del fenotipo CER. Sobre la base de estos dos ensayos, puede clasificarse cada línea por carácter, dentro de las siguientes categorías:

Resistencia

- a) uniformemente resistente
- b) que segrega en plantas resistentes y sensibles
- c) uniformemente sensible

Fenotipo CER

- a) fenotipo uniformemente CER
- b) que segrega en plantas con fenotipo CER y plantas con fenotipo normal
- c) fenotipo uniformemente normal

Las plantas recombinantes, que son homocigóticas respecto al gen *Nr* sin tener el fenotipo CER, pueden encontrarse:

1) En líneas que son uniformemente resistentes a *N. ribisnigri* y de las que no todas las plantas tienen el fenotipo CER, y

2) En líneas que tienen uniformemente un fenotipo normal y de las que no todas las plantas son sensibles a *N. ribisnigri*.

ES 2 210 528 T5

En el primer caso, las plantas sin el tipo CER se seleccionan para producción de semillas. La progenie de autopolinización de estas plantas seleccionadas se ensaya de nuevo en busca de resistencia y de fenotipo CER, y se conservan las líneas que son uniformemente resistentes y que tienen uniformemente un fenotipo normal (no CER).

5 En el segundo caso, las plantas resistentes se seleccionan para producción de semillas. La progenie de autopolinización de estas plantas seleccionadas se ensaya de nuevo en busca de resistencia y de fenotipo CER, y se conservan las líneas que son uniformemente resistentes y que tienen uniformemente un fenotipo normal (no CER).

10 3. Selección por medio de la técnica AFLP

Se recoge para ensayar un pequeño fragmento de hoja (por ejemplo, 50 mg) de cada planta, y se extrae ADN. Para llevar a cabo un estudio de la conexión entre marcadores AFLP y el gen *Nr*, también debe ensayarse cada planta de la que se toma una muestra en busca de resistencia a *N. ribisnigri*, lo que puede verificarse conforme al procedimiento anterior. La detección de AFLP u otros marcadores moleculares ligados al gen *Nr*, puede verificarse comparando el patrón de los marcadores de plantas individuales resistentes o sensibles o mezclando ADN de grupos de plantas sensibles o resistentes (denominados “agrupamientos”) y comparando los patrones de los marcadores de estos agrupamientos. Sobre la base de los patrones de los marcadores de plantas individuales de una población segregante, los marcadores ligados al gen *Nr* pueden ordenarse posteriormente en un mapa de marcadores, indicando la distancia genética mutuamente entre los marcadores, y entre los marcadores y el gen *Nr*. Los métodos para detectar el grado de conexión genética mutuamente entre los marcadores, y entre los marcadores y un carácter monogénico son métodos normales en la técnica y se describen en muchos manuales. El *software* para ordenadores para llevar a cabo estos estudios de conexión está disponible generalmente (por ejemplo, el programa “*Joinmap*”, distribuido por el CPRO-DLO en Wageningen).

25 Con un grupo de marcadores ligados estrechamente al locus *Nr*, las plantas pueden detectarse con uno o más eventos de recombinación en la proximidad del locus *Nr*. Las plantas con un evento de recombinación se caracterizan en que una proporción de los marcadores ligados al gen *Nr* están reemplazados por marcadores del parental sensible con fenotipo normal (no CER).

30 El desarrollo de marcadores y las determinaciones de marcadores para este proyecto se llevaron a cabo por Keygene NV, Agro Business Park 90, Post box 216, 6700 AE, Wageningen. Solamente se usó la técnica AFLP desarrollada y patentada por Keygene. Para los detalles de la técnica AFLP, se hace referencia en *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*, Nucleic Acids Research, 1995, 23 (21): 4407-4414, por P. Vos *et al.*

35 La técnica AFLP es ahora suministrada por varios suministradores, y está disponible para la persona de habilidad media. Para la persona de habilidad media, la detección de marcadores ligados estrechamente a un gen se ha convertido por esa razón en un asunto de rutina, en la medida en que están disponibles poblaciones adecuadas de plantas. Será evidente para la persona de habilidad media que eligiendo enzimas de restricción y cebadores pueden ser generados muchos marcadores AFLP diferentes que estén ligados a un cierto gen, y que para generar un grupo de marcadores ligados estrechamente con el objeto de detectar una recombinación meiótica en la proximidad de un locus, no es de una importancia esencial qué marcadores ligados estrechamente se usen para este propósito. Solamente es decisivo el número de marcadores usados, más la distribución sobre el fragmento de cromosoma en el que se desea detectar la recombinación.

45

(Esquema pasa a página siguiente)

50

55

60

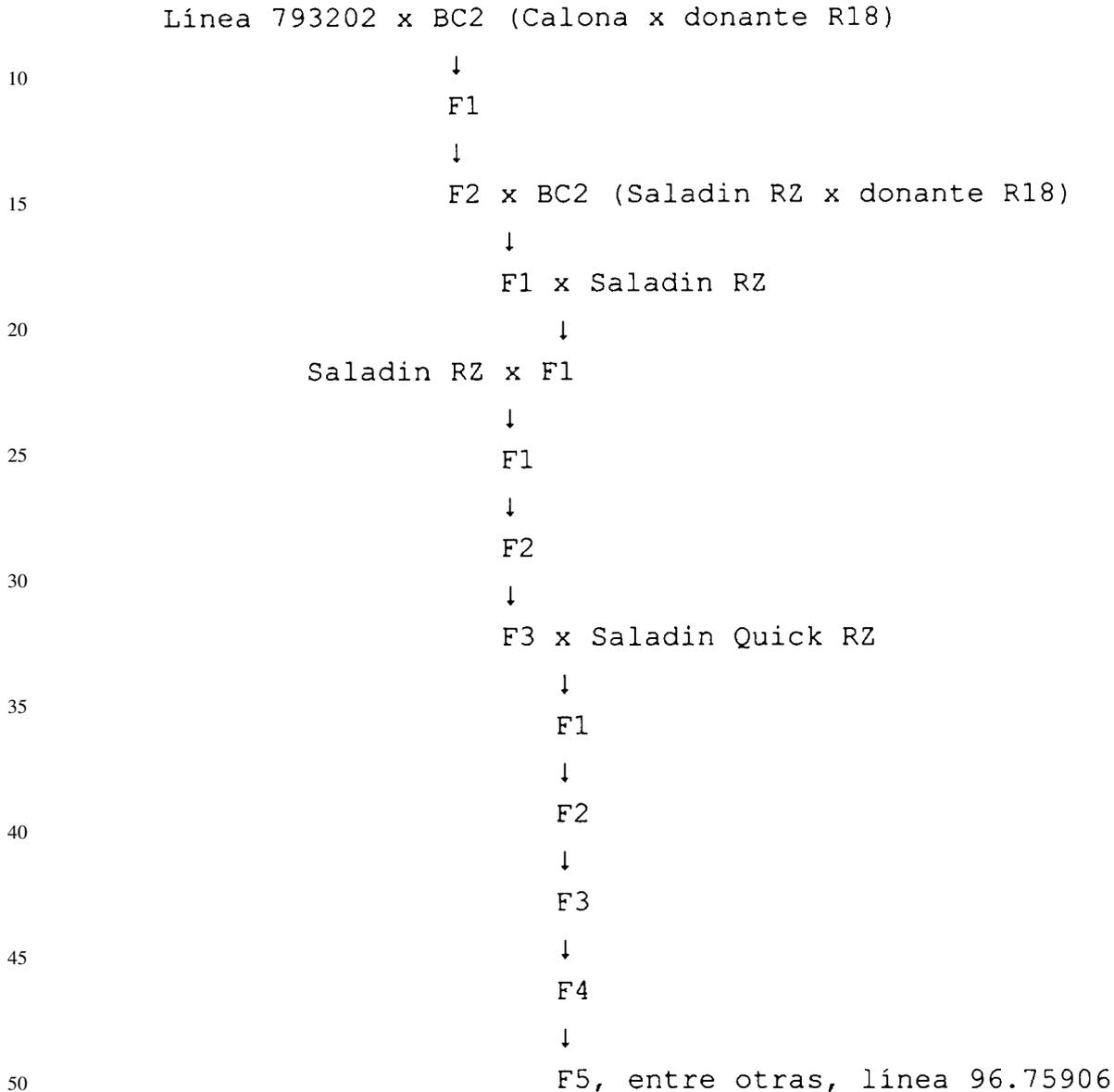
65

ES 2 210 528 T5

Ejemplo 1

Hibridación convencional

5 Se obtuvieron plantas de *L. sativa* L. conforme a la invención, conforme al esquema siguiente:



55 Se cruzó una planta de la línea IVT 793202, una de las líneas con el gen *Nr*, liberada en 1981 por el antiguo *Institute for Horticultural Plant Breeding* (IVT) de Wageningen, con una planta de la propia selección de los inventores, de tipo lechuga de cabeza crujiente (*crisphead*), con resistencia completa a la enfermedad del mildiu causada por *Bremia lactucae* (BC2 (Calona x donante R18)). La semilla F1 de este cruzamiento se sembró y se propagó hasta F2. Se ensayaron las plantas F2 en busca de resistencia a *N. ribisnigri* y en cuanto a su morfología, y se cruzó una planta F2 resistente seleccionada con una planta de tipo Saladin con resistencia completa a *B. lactucae* (BC2 (“Saladin RZ” x donante R18)). Se examinaron las plantas F1 de este cruzamiento en busca de resistencia a *N. ribisnigri*, y se retrocruzaron con una planta de tipo “Saladin RZ”. Las plantas F1 de este cruzamiento se examinaron en busca de resistencia a *N. ribisnigri* y se cruzaron de nuevo con una planta de tipo “Saladin RZ”. La semilla F1 de este cruzamiento se sembró y se propagó hasta F2. Las plantas F2 se examinaron en busca de resistencia a *N. ribisnigri* y en cuanto a su morfología, y una planta F2 resistente seleccionada del tipo lechuga de cabeza crujiente (*crisphead*) se propagó hasta la línea F3. Las líneas F3 se ensayaron una vez más en busca de resistencia y de fenotipo, y una planta F3 seleccionada del tipo lechuga de cabeza crujiente (*crisphead*) se cruzó con una planta del tipo “Saladin Quick RZ”.
65 La generación F1 de este cruzamiento se examinó en busca de resistencia a *N. ribisnigri* y se propagó hasta F2. Se ensayaron plantas de las generaciones F2, F3 y F4 que tenían su origen en una planta F1 de esta hibridación, en busca de resistencia a *N. ribisnigri* y de fenotipo. Se encontró que plantas F2 y F3 seleccionadas que combinaban resistencia

ES 2 210 528 T5

con un fenotipo no CER deseado, fueron siempre heterocigóticas respecto al gen *Nr*. Sin embargo, en la generación F4 de este cruzamiento, se encontró finalmente una línea que era uniforme respecto al fenotipo normal (lechuga de cabeza crujiente (crisphead)), es decir, no mostraba síntomas de CER y además todavía segregaba para resistencia a *N. ribisnigri*. Se produjeron semillas de varias plantas de esta línea F4. Se encontró que la progenie de unas cuantas de estas plantas F4 (entre otras, la línea RZ 96.75906) ya no segregaba para resistencia a *N. ribisnigri*, y por lo tanto, combinaba que era homocigótica respecto al gen *Nr* con un fenotipo agrónomicamente valioso, debido a la ausencia de síntomas de CER.

Debe observarse aquí que el ejemplo descrito en la presente invención proporciona la historia del desarrollo y genealogía de plantas conforme a la invención. De ningún modo muestra todas las generaciones producidas que tienen su origen en esta serie de hibridaciones, sino solamente las generaciones de las que las plantas de la invención son progenie en línea directa. Se han examinado más ramas del esquema de hibridación y selección anterior, todas sin embargo sin el resultado final deseado, es decir, plantas homocigóticas y resistentes a *N. ribisnigri* sin síntomas de CER.

Ejemplo 2

Detección de productos recombinantes después de preselección con marcadores AFLP

Se obtuvieron plantas de *L. sativa* L. conforme a la invención, partiendo de un único cruzamiento para obtener un híbrido entre una planta de la línea resistente a *N. ribisnigri* IVT 793202 expedida por el antiguo *Institute for Horticultural Plant Breeding* y una planta de la variedad de lechuga de cabeza mantecosa (butterhead) "Ultra RZ". Se produjeron semillas de una planta F1 de este cruzamiento. Las semillas F2 de este cruzamiento se sembraron y se produjeron semillas F3 de varias plantas.

Se ensayaron luego 140 plantas de este cruzamiento en busca de resistencia, de una línea F3 que segregaba para resistencia (que tenía su origen en una planta F2 heterocigótica respecto al gen *Nr*). De las plantas ensayadas, 95 fueron resistentes y 32 sensibles, mientras que en 3 plantas no se obtuvo una puntuación clara de resistencia. De las plantas F3 sin una puntuación clara de resistencia, se recogió material de las hojas para un análisis de ADN. El punto de partida para la detección de los marcadores AFLP ligados al gen *Nr* fue en primer lugar un grupo de ensayos de ADN de 5 líneas de lechugas resistentes (que incluían la línea donante resistente IVT 793202), 3 líneas sensibles (que incluían Ultra RZ), 2 mezclas ("agrupamientos") de ADN de variedades sensibles a *N. ribisnigri* y 44 individuos de la línea F3 mencionada anteriormente de la hibridación entre IVT 793202 y Ultra RZ. En este estudio preliminar, se identificó un marcador AFLP co-dominante que estaba ligado completamente al gen de resistencia en el grupo de 44 plantas. Con este marcador co-dominante pueden distinguirse las plantas con resistencia homocigótica y heterocigótica.

Con el marcador AFLP co-dominante mencionado anteriormente, se examinaron posteriormente un total de 121 plantas F3 de la hibridación entre IVT 793202 y Ultra RZ. De este modo fue posible diferenciar las plantas F3 en 35 con resistencia homocigótica, 60 con resistencia heterocigótica y 26 sensibles. Los ADN de las plantas con resistencia homocigótica y de las plantas con sensibilidad homocigótica se agruparon separadamente. De estos agrupamientos "resistentes" y "sensibles" se prepararon 96 patrones de AFLP. Esto produjo aproximadamente 4300 bandas AFLP, de las cuales 110 estaban ligadas al gen *Nr* y 25 al alelo sensible en este locus. Se eligieron de aquí 19 marcadores AFLP para usar para el escrutinio de la recombinación en la proximidad del gen *Nr*. De estos 19 marcadores, 14 estaban ligados al gen *Nr* que produce la resistencia y 5 al alelo "sensible".

Sobre la base del ensayo con el marcador AFLP co-dominante indicado anteriormente, se identificaron dos plantas F3 que eran heterocigóticas respecto al gen *Nr*. De las semillas F4 que produjeron esas plantas, se sembraron 800 plantas por línea F4. Se tomaron muestras de material de las hojas de estas plantas y se aisló el ADN. Se usó ADN de un total final de 1575 plantas F4 para escrutar la recombinación para los marcadores, con los 19 marcadores AFLP elegidos. El resultado de la primera determinación fue que se obtuvo un indicio de recombinación para los marcadores para 206 plantas. Estas 206 plantas se ensayaron una vez más para los 19 marcadores AFLP. Esto dio finalmente como resultado una confirmación de un evento de recombinación en la proximidad del locus *Nr* para 162 plantas.

Se cultivaron semillas F5 de las 1575 plantas de las que se tomaron muestras. Se obtuvieron semillas F5 de 89 de las 162 plantas identificadas como recombinantes para los marcadores sobre la base del análisis AFLP. Las 89 líneas F5 que resultaron de aquí se ensayaron en busca de resistencia a *N. ribisnigri* y de fenotipo. En estos ensayos, se encontró una línea (94.85338) que ya no segregaba para resistencia (y tenía por lo tanto resistencia homocigótica respecto al gen *Nr*), pero que todavía segregaba para el fenotipo CER. Se analizaron de nuevo 50 plantas de la semilla número 94.85338 con varios marcadores AFLP. Después de un análisis con 22 marcadores AFLP ligados al gen *Nr*, se encontró que una de estas plantas era recombinante de manera homocigótica para 12 de los 22 marcadores. Se recuperaron semillas F6 (línea 95.85051) de esta planta. Se ensayó una vez más esta línea en busca de fenotipo y de resistencia, y de nuevo se encontró que todas las plantas de esta línea eran resistentes a *N. ribisnigri* y todas las plantas de esta línea tenían un fenotipo normal, es decir, no CER.

Se cultivaron semillas F7 de 11 plantas de la línea 95.85051. Esto dio como resultado, entre otras, la semilla número 96.85123, que fue depositada.

ES 2 210 528 T5

Ejemplo 3

Localización del gen de resistencia con la ayuda de estudios de AFLP

5 Las dos líneas recombinantes RZ 96.85123 y RZ 96.75906, y algunas líneas testigo, se ensayaron para 21 marcadores AFLP, los cuales, conforme a estudios previos de AFLP, se acoplaban al alelo de resistencia (marcadores cis). Los marcadores se desarrollaron sobre el cruzamiento IVT 793202 x Ultra. La secuencia más probable de los diversos marcadores en el genoma de la lechuga era también conocida de una investigación previa. Los genotipos ensayados fueron:

- 10 1. IVT 793202 (línea liberada, resistencia a *Nasonovia* + CSV)
2. Ultra (BOTERSLARAS sensible a *Nasonovia*, no CSV)
- 15 3. Saladin (variedad de lechuga *iceberg* sensible a *Nasonovia*, no CSV)
4. RZ 96.85123 (línea recombinante resistente a *Nasonovia* del ejemplo 2, no CSV)
- 20 5. RZ 96.75906 (línea recombinante resistente a *Nasonovia* del ejemplo 1, no CSV)

Los resultados con los marcadores están listados en la tabla siguiente:

TABLA 1

25 *Resultados con marcadores AFLP de 5 líneas de lechuga ensayadas para 21 marcadores AFLP acoplados al alelo de resistencia (marcadores cis), presentados en la secuencia intermedia más probable del genoma*

Línea/ variedad	Marcador cis ¹																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
IVT793202	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ultra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saladin	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
96.85123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96.75906	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

¹ +: marcador presente -: marcador ausente

40 De la tabla 1, se sigue que tres marcadores cis (N^{os} 3, 7 y 15) son también positivos en la variedad de lechuga *iceberg* "Saladin" y de este modo no son polimórficos entre esta variedad sensible a *Nasonovia* y el área de introgresión de *L. virosa* en IVT 793202. De las puntuaciones de los restantes marcadores, se sigue que las líneas recombinantes 96.85123 y 96.75906 corresponden a la parte izquierda del área de introgresión. En ambas líneas ha habido una recombinación entre los marcadores 12 y 13: a la izquierda del marcador 13 ambas líneas carecen de los marcadores cis. Por lo tanto es muy probable que el gen o genes que codifican CSV estén situados a la izquierda del marcador 13 en el fragmento de introgresión de *L. virosa*. La línea 96.75906 se diferencia de la otra línea recombinante en que la línea 96.75906 está también separada en el lado derecho: entre los marcadores N^{os} 15 y 16 ha habido una recombinación, la línea 96.75906 carece de los marcadores cis a la derecha del marcador 15. De esto puede concluirse que el gen de resistencia a *Nasonovia* está situado en alguna parte entre los marcadores N^{os} 12 y 16.

50

55

60

65

ES 2 210 528 T5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Plantas de lechuga de la especie *Lactuca sativa* L., que son resistentes al áfido *Nasonovia ribisnigri* debido a la presencia en el genoma del gen de resistencia *Nr*, **caracterizadas** porque la información genética responsable del fenotipo CER está ausente del genoma, al menos hasta tal grado que en presencia del gen *Nr* en condición homocigótica no se expresa el fenotipo CER.
- 10 2. Plantas conforme a la reivindicación 1, **caracterizadas** porque el gen de resistencia *Nr* está presente de manera homocigótica.
- 15 3. Plantas conforme a la reivindicación 1 ó 2, obtenibles mediante las siguientes etapas de:
- 15 a) seleccionar una planta parental que sea heterocigótica respecto a la resistencia *Nr*.
- 15 b) fabricar una población segregante,
- 20 c) producir una progenie de sustancialmente cada planta de la población segregante,
- 20 d) ensayar la progenie en busca de resistencia y de fenotipo CER,
- 25 e) seleccionar, a partir de una progenie adecuada, plantas que sean o resistentes o que no tengan el fenotipo CER,
- 25 f) producir semillas de estas plantas mediante autopolinización, y cultivar la progenie de estas semillas para obtener una línea, y
- g) ensayar la línea en busca de resistencia y de fenotipo CER, y seleccionar líneas que sean uniformemente resistentes y que tengan uniformemente un fenotipo no CER.
- 30 4. Plantas conforme a la reivindicación 3, **caracterizadas** porque la población segregante está producida mediante autopolinización de la planta parental, mediante cruzamiento de la planta parental con una planta resistente o mediante una técnica de dobles haploides.
- 35 5. Plantas conforme a la reivindicación 3 ó 4, **caracterizadas** porque la progenie adecuada de la etapa e) es una de la que las plantas o son uniformemente resistentes a *N. ribisnigri* y no todas tienen el fenotipo CER o no tienen uniformemente el fenotipo CER y no son todas sensibles a *N. ribisnigri*.
- 40 6. Plantas conforme a la reivindicación 4 ó 5, **caracterizadas** porque la progenie adecuada de la etapa e) es una de la que las plantas son tanto uniformemente resistentes a *N. ribisnigri* como no poseedoras uniformemente del fenotipo CER, en cuyo caso se omiten las etapas f) y g).
- 45 7. Plantas conforme a cualquiera de las reivindicaciones 3-6, **caracterizadas** porque el ensayo en la etapa d) está basado en la ausencia de un fenotipo CER visible para el ojo.
- 45 8. Plantas conforme a cualquiera de las reivindicaciones 3-7, **caracterizadas** porque antes de la etapa c), por medio de técnicas de biología molecular, se hace una preselección de plantas en las que se ha verificado un evento de recombinación entre la información genética de la resistencia y la información genética del fenotipo CER.
- 50 9. Plantas conforme a la reivindicación 8, **caracterizadas** porque las técnicas de biología molecular están formadas por la técnica AFLP.
- 55 10. Una progenie de plantas conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-9, obtenida de manera generativa o vegetativa.
- 55 11. Partes o derivados de plantas conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que son adecuadas para propagación, tales como tejidos orgánicos, tales como hojas, tallos, raíces, vástagos y similares, protoplastos, embriones somáticos, anteras, pecíolos, células en cultivo, semillas y similares.
- 60 12. Partes o derivados de plantas conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que son adecuadas para el consumo, tales como cabezas u hojas.
- 65

ES 2 210 528 T5

