

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 404**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2008 E 08701065 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2240598**

54 Título: **Marcador genéticamente relacionado con la resistencia a tobamovirus en el pepino y su utilización**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2013

73 Titular/es:

**ENZA ZADEN BEHEER B.V. (100.0%)
HALING 1E
1602 DB ENKHUIZEN, NL**

72 Inventor/es:

**MAZEREUW, JAAP;
VAN KAMPEN, BRIGIT;
FABER, NANNE y
WILTERDINK, RONALD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 403 404 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

Marcador genéticamente relacionado con la resistencia a tobamovirus en el pepino y su utilización

La presente invención se refiere a un marcador molecular genéticamente relacionado con, y capaz de identificar, un locus genético en el genoma del pepino (*Cucumis sativus* L.) que dota de una resistencia general contra tobamovirus, y especialmente contra dos tobamovirus patógenos de importancia comercial, es decir, virus del mosaico moteado verde del pepino (por sus siglas en inglés, CGMMV) y el virus del mosaico moteado del pepino (por sus siglas en inglés, CFMMV).

Las plantas de pepino (es decir, plantas de la especie botánica *Cucumis sativus*) pertenecen a la familia de las calabazas de las cucurbitáceas, que comprende también miembros de la familia como los melones y calabazas.

Los frutos comestibles de la planta se denominan generalmente pepinos. Los pepinos generalmente son frutos cilíndricos, de piel verde, que comprenden aproximadamente el 96% de agua. La planta de pepino *Cucumis sativus* L., que se cultiva desde hace mucho tiempo, es un importante cultivo hortícola en todo el mundo. Los pepinos se recogen normalmente en una fase inmadura y pueden utilizarse para la industria de encurtidos o el mercado de productos frescos.

Los tobamovirus que infectan las cucurbitáceas pueden ser clasificarse en dos subgrupos: subgrupo I que comprende las cepas y estirpes mencionados en la bibliografía como virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV, que comprende las cepas CV3, CV4, CGMMV-W, CGMMV-SH y CGMMV-Is), y el subgrupo II de fruta que comprende el virus del mosaico moteado del fruto del pepino (CFMMV), virus del mosaico moteado del kyuri verde (KGMMV), y la cepa Yodo de CGMMV, que está estrechamente relacionado con KGMMV y puede considerarse una cepa de él (Antigus, 2001).

El virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV) es un virus con ARN del género tobamovirus que produce una enfermedad grave de las cucurbitáceas.

Las cepas de CGMMV se describieron por primera vez en el Reino Unido y Europa (Ainsworth, 1935). El virus está presente en todos los tejidos (Hollings, 1975) y el virus se transmite rápidamente por las manos, ropas, cuchillos y otros equipos de los trabajadores y también es transportado por las semillas. El tratamiento térmico de las semillas se utiliza normalmente para controlar la contaminación vírica de las semillas (Kim, 2003). CGMMV también puede propagarse a través del agua en la superficie (Drost, 1988).

Los síntomas de amarilleamiento, moteado y rizado hacia abajo de las hojas se han descrito aunque tal vez los más significativos son los informes del moteado y la distorsión moderada-grave del fruto. Dicho moteado y distorsión de la fruta podría volver inercializables rápidamente los cultivos infectados.

El virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV) es quizás el más extendido y reconocido de los tobamovirus que infectan los cultivos de pepino. CGMMV es un problema mundial en zonas de producción de pepino como Holanda, España (Celix, 1996), Grecia (Varveri, 2002) y la India (Rashmi, 2005). Las pérdidas de rendimiento pueden ser del 15% (Fletcher, 1962). Se ha intentado encontrar resistencia en el pepino contra CGMMV (Hsiao, 1993) y se han encontrado algunas variedades asintomáticas de origen asiático (Kooistra, 1968).

El CFMMV es otro miembro de la familia de los tobamovirus que causan daños económicos significativos a las plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.). Los síntomas de la infección por el virus del mosaico moteado del fruto del pepino (CFMMV) se reconocen generalmente por primera vez en las frutas y las hojas apicales en una etapa de crecimiento relativamente avanzada. Los síntomas foliares incluyen mosaico grave, necrosis de las venas y moteado amarillo. En algunos casos, plantas completamente desarrolladas presentan graves síntomas de marchitamiento que conducen a un colapso de la planta. La rápida propagación vírica dentro de los invernaderos puede conducir a pérdidas significativas de cosechas.

Grink'ko (2005) en la enfermedad del mosaico de los pepinos de invernadero describe que las investigaciones de invernaderos en el sur de Rusia pusieron de manifiesto la aparición de síntomas de clorosis en el 50% al 100% de los híbridos de pepino originados por tobamovirus del mosaico moteado verde del pepino. Para combatir la infección, se sugieren medidas combinadas que incluyen la utilización de cultivos e híbridos resistentes y una desinfección del suelo y del equipo.

Considerando los daños económicos producidos por tobamovirus en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) y especialmente CGMMV y CFMMV, incluyendo sus variantes, es muy deseable proporcionar marcadores genéticos genéticamente relacionados con loci con resistencia genética contra los tobamovirus, o loci con particularidades cualitativas (por sus siglas en inglés, QTL) y capaces de identificarlos, y que transfieren esta resistencia a tobamovirus a variedades de *Cucumis sativus* L. económicamente importantes.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar dicho marcador genético.

Se da a conocer un procedimiento para proporcionar una planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) resistente a tobamovirus que comprende:

- (a) identificar un locus genético con resistencia a tobamovirus en una primera planta de pepino (*Cucumis sativus L.*);
- 5 (b) transferir el locus genético con resistencia a tobamovirus identificado a una segunda planta de pepino (*Cucumis sativus L.*);

10 en la que el locus genético con resistencia a tobamovirus se caracteriza por la presencia de un fragmento de ampliación de ácido nucleico de 246 pb utilizando la SEQ. ID. nº 1 y la SEQ. ID. nº 2 de cebadores del polimorfismo molecular con longitud del fragmento ampliada (por sus siglas en inglés, AFLP) en un ensayo de polimorfismo molecular con longitud del fragmento ampliada (AFLP).

Según la presente invención, la SEQ. ID. nº 1 del cebador comprende la secuencia de ácido nucleico 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CGT-3' y la SEQ. ID. nº 2 del cebador comprende la secuencia de ácido nucleico 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA C-3'.

15 El marcador del polimorfismo molecular con longitud de fragmento ampliada (AFLP) genéticamente relacionado con, y capaz de identificar, el presente locus genético de resistencia a tobamovirus también se denomina en la presente memoria marcador E22/M48-F-246 (fragmento del tamaño de la ampliación del AFLP con ácido nucleico: 246 pb, cuando se utilizan las SEQ. ID. nº 1 y nº 2 de los cebadores.

20 La primera planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) puede ser cualquier planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) que tiene un fenotipo resistente a tobamovirus, y especialmente CGMMV y CGMMV, conferida por el locus genético identificable por la presencia del fragmento de ampliación de ácido nucleico definido anteriormente (Marker E22/M48-F-246).

25 La presencia del fragmento de ampliación de ácido nucleico, o del marcador molecular E22/M48-F-246 de AFLP, y por lo tanto la resistencia presente que dota de locus genético, puede establecerse usando cualquier técnica adecuada de Biología Molecular para el análisis de productos de ampliación de ácidos nucleicos tales como la electroforesis en gel, la hibridación, cromatografía de afinidad, la fluorescencia, etc.

En una realización particularmente preferida, los fragmentos se amplían y se identifican utilizando una técnica de ampliación y detección de ácido nucleico denominada en la técnica polimorfismo molecular con longitud del fragmento ampliado (AFLP, Zabeau, 1993, y Vos, 1995).

30 El polimorfismo con longitud del fragmento ampliado (AFLP) es una técnica de la huella genética basada en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), que se desarrolló al principio de la década de 1990 por Keygene. AFLP utiliza enzimas de restricción para cortar el ADN genómico, seguido de ligadura de adaptadores de doble cadena complementarios a los extremos de los fragmentos de restricción. Un subconjunto de los fragmentos de restricción se amplía entonces usando pares de cebadores complementarios al adaptador y fragmentos de enzimas de restricción. Los fragmentos se visualizan en geles de poliacrilamida desnaturizantes ya sea por metodologías autorradiográfica o de fluorescencia.

Esto generalmente produce una multitud de fragmentos de ampliación de ácido nucleico de diferentes tamaños. Al comparar los fragmentos de ácido nucleico de ampliación obtenidos a partir de, por ejemplo, plantas sensibles y resistentes, discriminando fragmentos de ampliación de ácidos nucleicos pueden identificarse, denominado también marcadores, entre ambos fenotipos.

40 En el presente caso, un marcador AFLP específico, denominado marcador E22/M48-F-246 de AFLP, genéticamente relacionado con, y capaz de identificar, el presente locus de resistencia se identificado por la presencia de un fragmento de ampliación de ácido nucleico de 246 pares de bases. Este marcador sólo estaba presente, entre numerosos otros fragmentos de ampliación de AFLP no discriminativos, en los individuos resistentes y ausente en los individuos sensibles.

45 Hay que señalar que el análisis de AFLP de plantas de pepino (*Cucumis sativus L.*) utilizando las SEQ. ID. nº 1 y nº 2 de cebadores de AFLP, a fin de identificar un locus genético de resistencia a tobamovirus en una primera planta de pepino (*Cucumis sativus L.*), puede producir un segundo fragmento de ampliación de ácido nucleico que tiene una diferencia de tamaño con el presente marcador E22/M48-F-246 de AFLP de 2 pb. Según la presente invención, este fragmento de ampliación de ácido nucleico más grande (2 pb) no está genéticamente relacionado con, y es capaz de 50 identificar, el presente locus genético con resistencia a tobamovirus.

En otras palabras, la primera planta de pepino (*Cucumis sativus L.*), cuando se analizaban utilizando las SEQ. ID. nº: 1 y nº 2 de los cebadores de AFLP y AFLP, debe proporcionar el presente marcador E22/M48-F-246 de AFLP del tamaño indicado, pero puede, además, proporcionar también un segundo fragmento de ampliación de ácido nucleico de un tamaño mayor (2 pb).

5 Considerando lo anterior, la selección de una primera planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) comprende esencialmente la detección del locus genético de resistencia a tobamovirus en esta planta utilizando técnicas de Biología Molecular. Esto es debido a que el presente locus de resistencia a tobamovirus, genéticamente relacionado con el marcador E22/M48-F-246 de AFLP, no se puede crear usando sólo selección basada en el fenotipo común a las técnicas de reproducción convencionales.

En otras palabras, identificar un locus genético de resistencia a tobamovirus en una primera planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) no se refiere a utilizar un único proceso de selección convencional.

10 Después de la identificación del locus genético de resistencia a tobamovirus según la presente invención en una primera planta de pepino (*Cucumis sativus L.*), el locus genético se transfiere a una segunda planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) lo que dota de resistencia a tobamovirus a dicha segunda planta de pepino (*Cucumis sativus L.*)

15 La transferencia del presente locus genético de resistencia a tobamovirus puede comprender procedimientos convencionales de cultivo, como el cruce convencional de la primera planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) con la segunda planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) y uno o más retrocruzamiento posteriores con la segunda planta de pepino (*Cucumis sativus L.*). Sin embargo, dichos procedimientos convencionales de cultivo pueden estar asistidos con técnicas de biología molecular para crear el mantenimiento del presente locus de resistencia genética en la segunda planta de pepino (*Cucumis sativus L.*).

20 En comparación con las técnicas convencionales de cultivo, el suministro del presente marcador E22/M48-F-246 de AFLP según la presente invención permite una rápida selección de la descendencia resistente a tobamovirus adecuado después de cada etapa de retrocruzamiento evitando por consiguiente los métodos de detección laboriosos y costosos, tales como la infección vírica y la creación de un fenotipo resistente, en cada generación para identificar la descendencia resistente al tobamovirus apropiado.

25 La segunda planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) puede ser una variedad comercial sensible a tobamovirus. Al transferir el presente locus genético con resistencia a esta planta, manteniendo al mismo tiempo otras características genotípicas y fenotípicas de alta calidad con valor comercial, se proporciona una planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) con mayor valor económico.

El presente método puede proporcionar una planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) que tiene el genotipo de la segunda planta de pepino (*Cucumis sativus L.*), complementado con un locus genético con resistencia a tobamovirus de la primera planta de pepino (*Cucumis sativus L.*).

30 Por lo tanto, se da a conocer una planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) que comprende el genotipo de una variedad de planta de pepino sensible a tobamovirus (*Cucumis sativus L.*) complementado con un locus con resistencia genética a tobamovirus, en el que el locus con resistencia genética a tobamovirus se caracteriza por la presencia de un fragmento de ampliación de ácido nucleico de 246 pb, utilizando los cebadores SEQ. ID. n° 1 y SEQ. ID. n° 2 del polimorfismo molecular con longitud de fragmento ampliada (AFLP) en un ensayo con polimorfismo molecular con longitud de fragmento ampliado (AFLP).

35 La resistencia a tobamovirus, por lo tanto el locus genético de resistencia a tobamovirus según la presente invención, al menos dota, en una realización preferida, de resistencia contra el virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV) y el virus del mosaico moteado del fruto del pepino (CFMMV).

40 La presente invención se refiere a la utilización de un locus genético de resistencia a tobamovirus para proporcionar a la planta del pepino (*Cucumis sativus L.*) resistente al tobamovirus, en la que el locus genético de resistencia al tobamovirus se caracteriza como se ha definido anteriormente.

Según la presente invención, la resistencia a tobamovirus comprende la resistencia al virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV) y al virus del mosaico moteado del fruto del pepino (CFMMV).

45 Se da a conocer un locus genético de resistencia a tobamovirus caracterizado por un fragmento de ampliación de ácido nucleico de 246 pb utilizando la SEQ. ID. n° 1 y la SEQ. ID. n° 2 de los cebadores del polimorfismo molecular con longitud de fragmento ampliado (AFLP) en un ensayo de polimorfismo molecular con longitud de fragmento ampliado (AFLP).

50 Cabe señalar que los loci genéticos, sólo indicados por un fragmento de ampliación de ácido nucleico AFLP, utilizando los cebadores SEQ. ID. n° 1 y SEQ. ID. n° 2 del polimorfismo de longitud de fragmento ampliado (AFLP), que es ligeramente mayor (2 pb) en comparación con el fragmento anterior, no están abarcados por la presente invención.

La presente invención se detallará más en los ejemplos adjuntos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de plantas de pepino sensibles y resistentes (*Cucumis sativus L.*)

Introducción

5 El siguiente protocolo se utilizó para clasificar plantas de pepino (*Cucumis sativus L.*) como sensibles o resistentes a la infección por un virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV) y por el virus del mosaico moteado del fruto del pepino (CFMMV). Al menos para Holanda, el mejor momento para realizar el análisis es desde septiembre hasta abril.

Material Vegetal

10 Las plantas (*Cucumis sativus L.*) a ensayar, resistentes y sensibles, se sembraron en vermiculita de tamaño medio y se cultivaron a 24°C, cubierta con vermiculita de tamaño pequeño. Después de 4 a 5 días (cotiledones recién desplegados), los plántones se transfirieron a bloques de lana de vidrio y, después de 2 días, las plantas se transfirieron a un invernadero en cuarentena.

Después de cada bloque de 40 cifras, la referencia sensible Tyria F1 (variedad de pepino F1 comercial de Enza Zaden, Holanda) se coloca como referencia sensible, y los plántones se inocularon en los cotiledones, preferentemente cuatro días después de colocarlos en el invernadero en cuarentena.

Patógenos

15 Se prepararon cepas de CGMMV y CFMMV. En resumen, para preparar los inóculos, se preparó tampón de fosfato reciente (solución de fosfato 0,1 M, pH de 7,7). Se recogió material foliar de una planta de pepino (*Cucumis sativus L.*) infectada de la que se desarrollaron los síntomas recientemente. Se tomó tejido foliar joven sin tallos con síntomas claros. Aproximadamente 1 gramo de material foliar se utilizó para 5 ml de tampón. El material foliar se molió, obteniéndose de este modo cepas víricas.

20 Para la infección, cuando aparecía tiempo soleado, las plantas, como las cultivadas anteriormente, se taparon con una cubierta un día antes de la infección. Un día después de la infección, la cubierta se puede quitar. Sin embargo, en caso de alta intensidad de luz, la tapa debería permanecer un día más. En caso de baja humedad, la humedad se puede aumentar mojando las bandejas grises directamente después de la infección para evitar el resaca de los cotiledones debido al daño de la infección. Los regímenes de temperatura eran de 18 a 20°C durante la noche y de 22 a 25°C durante el día.

25 Las plantas se pulverizaron ligeramente con carborundo a través de una gasa doble. Se sumergió una esponja en los inóculos y dos veces se limpió a lo largo de la superficie total de ambos cotiledones. Aunque el virus era estable, el tiempo de la infección debe ser inferior a 1 hora.

Evaluación

30 Las dos primeras hojas de las plantas de pepino no presentarán síntomas (en las plantas sensibles, así como en las plantas resistentes). De la tercera a la cuarta etapa foliar, los síntomas serán fáciles de anotar sensible o resistente.

Ejemplo 2: Identificación de marcadores AFLP que identifican una resistencia a tobamovirus QTL

Introducción

35 En este ejemplo, se identificó un locus con particularidades cualitativas (QTL) en plantas pepino (*Cucumis sativus L.*) resistentes utilizando un análisis de QTL en volumen (BQA), realizado por Keygene N.V. (Wageningen, Holanda). Se seleccionó una población de 98 individuos para el desarrollo del marcador de resistencia a tobamovirus. Un total de 96 combinaciones de cebadores AFLP se seleccionaron en dos grupos que contenían individuos que presentan "fenotipos extremos" para la resistencia a tobamovirus. Posteriormente, cinco marcadores experimentales se verificaron en 12 individuos resistentes y 12 sensibles.

40 Identificación y verificación de marcadores

Se obtuvo material foliar de 130 plantas: una población Cuc1879-01 x OK561 de 98 individuos para proporcionar la población que va a ensayarse, 30 estirpes endogámicas del progenitor donante Cuc1879-01 y las estirpes progenitoras de la población. Se aisló ADN y se generaron plantillas EcoRI/MseI. Una huella digital de prueba de las 130 plantas se generó usando combinación de cebadores E14/M59.

45 BSA y verificación en individuos

El BQA se realizó cribando un total de 96 combinaciones de cebadores en un grupo que contiene diez individuos "resistentes extremos" y un grupo que contiene diez individuos "sensibles extremos". Este cribado dio como resultado la identificación de los marcadores experimentales siguientes:

– E14/M58-F-169-P2

50 – E22/M48-F-248/246 (bi-alélico)

Estos marcadores se verificaron posteriormente en 24 individuos (12 individuos resistentes y 12 individuos sensibles). Sobre la base de esta verificación, los marcadores experimentales identificados demostraron estar relacionados con la resistencia a tobamovirus.

Verificación de marcadores experimentales en la población

- 5 Después del cribado de las 96 combinaciones de cebadores y la posterior validación de los marcadores, un supuesto QTL podría identificarse. A fin de determinar si el QTL identificado es de hecho un QTL independiente se ejecutó un análisis de enlace.

Los marcadores (E14/M58-F-169-P2 y el marcador bialélico E22/M48-F-248/246) se seleccionaron en 46 individuos más de la población de 98 individuos.

- 10 Se generó un conjunto de datos del marcador y se fusionó con el conjunto de datos de marcador de la verificación en los 24 individuos. Basándose en este análisis, se podría concluir que los cuatro marcadores están realmente acoplados a un QTL.

Análisis del marcador utilizando WinQTLCartographer

- 15 A fin de determinar la correlación entre el fenotipo y el genotipo, el conjunto de datos de marcador se analizó utilizando el paquete de programa informático WinQTLCartographer. Para el análisis de un solo marcador (SMA) se calculó un valor LOD de 12. Por cartografía de intervalos (IM) se calculó el umbral del 95% de fiable realizando 1000 permutaciones de los datos fenotípicos y se determinó como LOD de 0,9. El valor de LOD y las varianzas explicadas en porcentaje se calcularon para este QTL (LOD: 9; Exp. Var.: 49,5).

Conclusión

- 20 A fin de identificar un QTL para la resistencia tobamovirus, se realizó un BQA. Un total de 96 combinaciones de cebadores se cribaron en un volumen de diez individuos "resistentes en extremo" y un volumen de diez individuos "sensibles en extremo". Marcadores experimentales, de los cuales uno era bialélico, se verificaron en 12 individuos "resistentes en extremo" y 12 "sensibles en extremo" y en otros 48 individuos de la población. Se identificó una región QTL utilizando un enfoque BQA. Este QTL explica ~ 50% de la varianza. Basándose en la TestPC (~ cinco marcadores) no se identificó ninguna heterogeneidad en las 30 estirpes endogámicas del precursor Cuc1879-01 donante resistente.

Ejemplo 3: Identificación asistida por marcadores moleculares de plantas de pepino resistentes a tobamovirus (*Cucumis sativus* L.)

Análisis Molecular

- 30 Tanto de las plantas sensibles, es decir, que presentan uno o más de los síntomas de una infección vírica tal como se describió anteriormente, como de cada una de las plantas de pepino resistentes (*Cucumis sativus* L.) se aisló material genómico utilizando protocolos estándar.

- 35 Posteriormente, este material genómico se digirió utilizando las enzimas de restricción apropiadas (EcoRI/MseI) y, después de la ligadura de los adaptadores, se sometió a ampliación de ácido nucleico AFLP usando el par de cebadores SEQ. ID. nº 1 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CGT-3' y SEQ. ID. nº 2 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA C-3' o el par de cebadores SEQ. ID. nº 3 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAT-3' y SEQ. ID. nº 4 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACG T-3'.

- 40 Los productos de ampliación resultantes se resolvieron mediante electroforesis en gel para la determinación del tamaño. La presencia de marcadores de AFLP en los genomas de cada una de las plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) se detectaron como ausentes (-) o como presentes (+).

- 45 Específicamente, cuando el marcador E14/M58-F-169 de AFLP (no incluido en la presente invención, SEQ. ID. nº 3 y nº 4) estaba presente, se observaba una banda de aproximadamente 169 pb; cuando el marcador E22/M48-F-248 de AFLP (no incluido en la presente invención, los cebadores SEQ. ID nº 3 y nº 4) estaba presente, se observaba una banda de aproximadamente 248 pb. El marcador E14/M48-F-246 de AFLP (incluido en la presente invención, los cebadores SEQ. ID. nº: 3 y 4) con un tamaño estimado de aproximadamente 246 pb genéticamente correlacionado con el fenotipo resistente.

Los resultados se resumen en la Tabla 1 a continuación.

ES 2 403 404 T3

Tabla 1: Correlación entre los marcadores E14/M58-F-169; E22/M48-F-246 y E22/M48-F-248 de AFLP y un fenotipo resistente a tobamovirus

Plantas de pepino individuales (<i>Cucumis sativus</i> L.)	Fenotipo	E14/M58-F-169	E22/M48-F-246	E22/M48-F-248
TLCG04_4816_10	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_18	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_133	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_23	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_24	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_31	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_43	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_56	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_57	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_61	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_64	sensible	+	-	+
TLCG04_4816_66	sensible	+	-	+
T33169_9	resistente	-	+	-
T33168_2	resistente	-	+	-
T33168_4	resistente	-	+	-
T33168_5	resistente	-	+	-
T33168_6	resistente	-	+	-
T33168_7	resistente	-	+	-
T33168_8	resistente	-	+	-
T33168_9	resistente	-	+	-
T33169_2	resistente	-	+	-
T33169_3	resistente	-	+	-
T33169_5	resistente	-	+	-
T33169_6	resistente	-	+	-

5 La Tabla 1 demuestra claramente que la resistencia contra CGMMV y CFMMV está en todas las plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) ensayadas genéticamente relacionadas con la presencia de marcadores moleculares AFLP

E22/M48-F-246. Por lo tanto, la detección de este marcador indica la presencia de un locus genético de resistencia a tobamovirus o QTL.

Bibliografía

- Ainworth, G.C. 1935. Mosaic disease of cucumber. *Ann. Appl. Biol.* 22:55-67 .
- 5 Antignus, Y. 2001. Biological and Molecular Characterization of a New Cucurbit-Infecting Tobamovirus. *Phytopathology* Vol. 91, nº 6, 2001 565-571.
- Rashmi, C.M. 2005. Natural occurrence of Cucumber green mottle mosaic virus on gherkins (*Cucumis anguria* L.). *Environment and Ecology*. 2005; 23S(special 4):781-784.
- Varveri, V. 2002. Characterization and detection of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus in Greece.
- 10 Dorst, H. J.M. van. 1988. Surface water as a source in the spread of cucumber green mottle mosaic virus. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 1988; 36(3):291-299.
- Hsiao, C.H. 1993. Screening and breeding for resistance to viruses in cucurbits. *Plant Pathology Bulletin*. 1993; 2 (4) :241-248.
- Fletcher. 1962; *Plant Pathology* 18;16.
- 15 Hollings, M. 1975. Cucumber green mottle mosaic virus. Description of Plant viruses nº154.
- Celix, A. 1996. First report of cucumber green mottle mosaic tobamovirus infecting greenhouse grown cucumber in Spain. *Plant Disease*. 1996;80(11):1303.
- Kim SangMin 2003. Destruction of green mottle mosaic virus by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by TR-PCR. *Molecules and Cells*. 2003;16(3):338-342.
- 20 Kooistra E. Significance of the non-appearance of visible disease symptoms in cucumber (*Cucumis sativus* L.) after infection with Cucumis virus 2. *Euphytica* 17 (1968): 136-140.
- Vos, P., Hogers, R, Bleeker, M., *et al.* 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407 – 4414.
- 25 Zabeau, M y P. Vos. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Office, publication 0 534 858 A1 , bulletin 93/13.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un marcador molecular para la identificación de un locus genético en un genoma de la planta de pepino que dota de una resistencia contra tobamovirus, en el que dicho locus genético que dota de una resistencia contra tobamovirus se caracteriza por un fragmento de amplificación de ácido nucleico de 246 pb utilizando los cebadores SEQ. ID. nº 1 y SEQ. ID. nº 2 del polimorfismo molecular de longitud de fragmentos ampliados (AFLP) en un ensayo del polimorfismo molecular con longitud fragmento ampliado (AFLP).
2. Utilización según la reivindicación 1, en el que dicha resistencia al tobamovirus comprende la resistencia al virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV) y al virus del mosaico moteado del fruto del pepino (CFMMV).
- 10 3. Utilización según la reivindicación 1, en el que dicha resistencia al tobamovirus comprende la resistencia al tobamovirus de uno o más subgrupos 1 y 2.