

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 094**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01H 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2005 E 05797992 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1812575**

54 Título: **Plantas de tomate que tienen niveles más elevados de resistencia a Botrytis**

30 Prioridad:

25.10.2004 EP 04077931

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

27.12.2013

73 Titular/es:

**MONSANTO INVEST N.V. (100.0%)
Leeuwenhoekweg 52
2661 CZ Bergschenhoek, NL**

72 Inventor/es:

**VAN KAN, JOHANNES ARNOLDUS LAURENTIUS;
TEN HAVE, ARJEN;
LINDHOUT, WILLEM HENDRIK;
FINKERS, HENDRIKUS JOHANNES;
VAN BERLOO, REMCO y
VAN HEUSDEN, ADRIAAN WILLEM**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 436 094 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas de tomate que tienen niveles más elevados de resistencia a *Botrytis*

5 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a fitomejoramiento y biología molecular. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para detectar un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con resistencia a *Botrytis cinerea* en tomate, a un método de producción de una planta de tomate resistente a *Botrytis* con ello y a plantas de tomate resistentes a *Botrytis* obtenidas de este modo y partes de las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Botrytis cinerea es un hongo patógeno necrotrófico con un rango de huéspedes excepcionalmente amplio que comprende, como mínimo, 235 posibles huéspedes. Debido a su amplio rango de huéspedes y debido a que afecta económicamente a partes importantes de la planta, *B. cinerea* es un problema fundamental en muchos cultivos de desarrollo comercial. Entre los agricultores, el hongo se denomina habitualmente como *Botrytis*. El tomate cultivado (principalmente *Lycopersicon esculentum*) también es susceptible a infección por *Botrytis* y el hongo generalmente afecta al tallo, las hojas y el fruto de la planta de tomate. En invernaderos calefactados la aparición de infecciones por *Botrytis* en los tallos es particularmente habitual.

Botrytis mata activamente las células infectadas, causando podredumbre húmeda, chancros, mancha foliar, mal de los semilleros y cánceres de tallo. Las hojas afectadas quedan cubiertas por conidióforos y conidios, y posteriormente se repliegan y se marchitan. El hongo crecerá a partir de hojas enfermas en el tallo y producirá lesiones secas, de color marrón claro de unos pocos milímetros a varios centímetros de longitud. Las lesiones también pueden formarse en cicatrices de poda en el tallo. Las lesiones del tallo también pueden estar cubiertas con un moho gris. En casos graves, la infección rodea al tallo y mata a la planta. El tejido más viejo, senescente, de una planta de tomate es habitualmente más susceptible al ataque por *Botrytis* que el tejido más joven.

Para prevenir el desarrollo de *Botrytis* en tomates cultivados en invernadero, la temperatura y la humedad relativa deben estar reguladas estrechamente. Es importante, además, proporcionar agua sin humedecer las hojas. Para plantas cultivadas en el campo, deben emplearse un buen drenaje y control de las malas hierbas. Además, los niveles de nutrientes de las plantas deben mantenerse elevados. Sin embargo, estas medidas preventivas no pueden evitar completamente la aparición de pérdidas de rendimiento considerables en caso de infección.

Están disponibles fungicidas para controlar a *Botrytis* en tomates cultivados tanto en invernadero como en el campo. Los ejemplos de algunos fungicidas incluyen Dovicide A® y clorotalonil, que también pueden aplicarse a los frutos de tomate después de la cosecha. Sin embargo, se sabe que *Botrytis* ha desarrollado resistencia contra varios fungicidas utilizados habitualmente. Además, la utilización de fungicidas no se desea desde una perspectiva tanto económica como medioambiental. Actualmente, existe una necesidad de variedades comerciales de tomate que muestren resistencia a *Botrytis*.

Se ha descubierto resistencia parcial a *Botrytis* en varias especies silvestres de *Lycopersicon* (Egashira y otros 2000; Nicot y otros 2002; Urbasch 1986). Estas plantas, sin embargo, no producen tomates de cultivo comerciales.

Es conocido del documento WO 02/085105 que *L. hirsutum* comprende una región genética en el cromosoma 10 del genoma que está implicada en la resistencia parcial a *Botrytis*. Se cree que la introgresión de este material genético en variedades cultivadas de tomate es capaz de proporcionar plantas cultivadas de tomate que son parcialmente resistentes a *Botrytis*.

Hasta ahora, sin embargo, los programas de obtención dirigidos a proporcionar resistencia a *Botrytis* en tomate han tenido un éxito limitado. La razón para estos malos resultados actualmente no está clara. Por un lado, esto puede deberse al insuficiente conocimiento de la base genética y la herencia de la resistencia a *Botrytis*. Por otro lado, esto puede deberse a la falta de bioensayos apropiados para evaluar los niveles de resistencia a *Botrytis* en plantas de tomate obtenidas en programas de obtención. La falta de conocimiento y de métodos también complica la selección de plantas tanto entre números de registro de adquisiciones silvestres como plantas de la descendencia que comprenden genes implicados en la resistencia a *Botrytis*.

Es un objetivo de la presente invención mejorar el éxito de programas de obtención dirigidos a proporcionar variedades comerciales de tomate que son resistentes a *Botrytis*. Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar resistencia adicional y/o mejorada a *Botrytis* en variedades comerciales de tomate. Es otro objetivo más de la presente invención dar a conocer un método para descubrir números de registro de adquisiciones de *Lycopersicon* silvestre adicionales como fuentes de resistencia a *Botrytis* y para descubrir material genético adicional en el genoma de dichas plantas que está implicado en la resistencia del tomate a *Botrytis*. Dichas fuentes adicionales y material genético adicional pueden utilizarse para ampliar la base para la producción de variedades resistentes a *Botrytis* de tomate cultivado.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han descubierto actualmente que un bioensayo cuantitativo particular que comprende la medición de parámetros iniciales y/o progresivos de infección con *Botrytis* en plantas de tomate en combinación con una técnica de detección de un marcador molecular proporciona un método muy ventajoso para detectar fuentes de resistencia a *Botrytis* entre números de registro de adquisiciones de *Lycopersicon* silvestres y para detectar material genético en el genoma de dichas plantas que está implicado en resistencia mejorada de tomate a *Botrytis*.

Utilizando esta combinación de técnicas, los inventores de la presente invención han identificado con éxito resistencia parcial a *Botrytis* en dos líneas de parientes silvestres del tomate, es decir *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 y *Lycopersicon parviflorum* G1.1601.

Los inventores fueron capaces posteriormente de producir plantas de tomate resistentes a *Botrytis* cruzando plantas de esas líneas de tomate (donadoras) silvestres resistentes a *Botrytis* con plantas de tomate receptoras no resistentes. Estas plantas mostraban un nivel más elevado de resistencia que las plantas que comprenden una región genómica en el cromosoma 10 de *L. hirsutum* asociada con resistencia a *Botrytis*, tal como se da a conocer en el documento WO 02/085105.

Evaluando el nivel de resistencia a *Botrytis* en poblaciones segregantes (poblaciones F₂) de estos cruces recién producidos en relación con la presencia de marcadores moleculares de la planta donadora, los inventores de la presente invención fueron capaces de identificar múltiples loci de rasgo cuantitativo (QTL) ligados con resistencia a *Botrytis* en las líneas silvestres de tomate resistentes y, de este modo, establecer la ubicación de múltiples secuencias de ADN que otorgan resistencia en el genoma. Como resultado, los inventores de la presente invención han descubierto ahora que la resistencia a *Botrytis* en tomate se hereda de forma poligénica, lo que puede explicar parcialmente los malos resultados de obtención. Este descubrimiento proporciona la mejora de métodos de producción de plantas de tomate resistentes a *Botrytis*. Más adelante en la descripción, un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con resistencia a *Botrytis* en tomate será denominado de forma abreviada como un QTL para resistencia a *Botrytis* o un QTL asociado con resistencia a *Botrytis*.

Un total de seis nuevos QTL para resistencia a *Botrytis* se descubrieron en las dos líneas de tomate silvestre. Cuatro de estos seis QTL podrían estar ligados a un parámetro cuantitativo que reflejaba la capacidad de la planta para reducir el establecimiento inicial de una infección, denominado en lo sucesivo en el presente documento como el parámetro para incidencia de la enfermedad. Dos de estos seis QTL podrían estar ligados a un parámetro cuantitativo que reflejaba la capacidad de la planta para ralentizar el avance de la infección, denominado en lo sucesivo en el presente documento como el parámetro para la tasa de crecimiento de la lesión.

Produciendo mapas de ligamiento genético, se descubrió que el cromosoma 1 de *L. hirsutum* LYC 4/78 alberga un QTL que está ligado con una tasa de crecimiento reducida de lesiones inducidas por infección por *Botrytis* y que ambos cromosomas 2 y 4 de ese mismo número de registro de adquisiciones albergan un QTL que está ligado con una incidencia de enfermedad reducida. En *L. parviflorum* G1.1601, se descubrió que un QTL para una tasa de crecimiento de la lesión reducida estaba ubicado en el cromosoma 9, mientras que se descubrió que dos QTL diferentes para incidencia de la enfermedad reducida estaban ubicados en los cromosomas 3 y 4. Un QTL en el cromosoma 10, tal como se ha descrito en la técnica anterior, no podía detectarse mediante este método. Utilizando el bioensayo cuantitativo mencionado anteriormente, todos los QTL en *L. hirsutum* LYC 4/78 ensayados hasta ahora podían confirmarse evaluando la resistencia la enfermedad en progenies de BC₂S₁ (retrocruzamiento 2, autofertilizadas) que segregan para los QTL en investigación.

La presente invención se refiere, en un primer aspecto, a una planta de tomate de esculentum resistente a *Botrytis*, según la reivindicación 1

Se describe, además, un método para detectar un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con resistencia a *Botrytis* en tomate. El método comprende las etapas de cruzar una planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* con una planta de tomate receptora no resistente o parcialmente resistente (susceptible a *Botrytis*); poner en contacto una o más plantas de la descendencia con una cantidad infectante de *Botrytis*; determinar cuantitativamente la incidencia de la enfermedad y/o la tasa de crecimiento de lesiones en dichas una o más plantas de la descendencia; establecer un mapa de ligamiento genético que liga la incidencia de la enfermedad y/o la tasa de crecimiento de lesiones observadas con la presencia de marcadores cromosómicos de dicha planta donadora de tomate en dichas una o más plantas de la descendencia; y asignar a un locus de rasgo cuantitativo los marcadores contiguos en dicho mapa que están ligados a una incidencia de la enfermedad reducida y/o una tasa de crecimiento de lesiones reducida.

Se describen, además, QTL que pueden obtenerse mediante un método para detectar un QTL para resistencia a *Botrytis* según la presente invención tal como se ha perfilado anteriormente. Estos QTL son diferentes de los QTL de la técnica anterior. Para uno, los QTL de la técnica anterior podían no ser descubiertos. Además, los QTL de la

presente invención son más informativos que los de la técnica anterior dado que son indicativos de una característica relativa a la capacidad de la planta para oponerse al inicio de la enfermedad, o una característica relativa a la capacidad de la planta para ralentizar el avance de la enfermedad. Dicha información es muy valiosa en programas de obtención, dado que combinaciones de las mismas pueden proporcionar adecuadamente resistencia mejorada, y la herencia apropiada del rasgo de resistencia de una generación a otra puede estar mejor controlada.

El presente documento describe un QTL para resistencia a *Botrytis* en tomate, en el que dicho QTL se selecciona entre el grupo que comprende los QTL en los cromosomas 1, 2 y 4 de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 y los QTL en los cromosomas 3, 4 y 9 en *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 asociados con resistencia a *Botrytis*. Estos QTL están ubicados en posiciones del genoma que no se han asociado previamente con resistencia a *Botrytis*. Los detalles de estos QTL se describen con más detalle a continuación en el presente documento.

Un QTL tal como se describe en el presente documento puede estar en forma de una secuencia de ácido nucleico aislada, preferentemente de cadena doble que comprende dicho QTL o una parte del mismo que otorga resistencia. De forma muy adecuada, el tamaño de la secuencia de ácido nucleico, que puede, por ejemplo, aislarse a partir del cromosoma de una planta donadora adecuada, puede representar una distancia genética de 1-100 cM, preferentemente 10-50 cM en dicho cromosoma. Dicho ácido nucleico puede comprender, como mínimo, 50, más preferentemente, como mínimo, 500, aún más preferentemente, como mínimo, 1000, todavía más preferentemente, como mínimo, 5000 pares de bases. Una o más secuencias de ácido nucleico que comprenden un QTL o una parte del mismo que otorga resistencia puede estar comprendida, a su vez, en una construcción de ácido nucleico, dicha construcción puede comprender, además, regiones que flanquean dicha una o más secuencias de ácido nucleico y regiones que son capaces de estar integradas en un vector adecuado para transferencia de dicha una o más secuencias de ácido nucleico en una planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis* adecuada. El vector puede comprender, además, regiones promotoras adecuadas u otras secuencias reguladoras. Los QTL también pueden estar en una forma presente dentro del genoma de una planta de tomate. Los QTL comprenden preferentemente, como mínimo, un marcador, preferentemente dos, más preferentemente tres, todavía más preferentemente cuatro, todavía más preferentemente más de cuatro marcadores asociados con resistencia a *Botrytis* seleccionados entre el grupo que comprende los marcadores de las tablas 1 y 2 y los marcadores tal como se indica en las figuras 1, 5 y 6 ligados a dicho QTL.

En el presente documento se describe un método de producción de una planta de tomate resistente a *Botrytis*. El método comprende las etapas de detectar un QTL para resistencia a *Botrytis* en una planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* realizando uno cualquiera de los métodos para detectar un locus de rasgo cuantitativo (QTL) para resistencia a *Botrytis* y transferir el ácido nucleico que comprende, como mínimo, un QTL detectado de este modo, o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis*, a partir de dicha planta donadora a una planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis*.

La transferencia de ácido nucleico que comprende, como mínimo, un QTL o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis* puede realizarse de forma muy adecuada cruzando dicha planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* con una planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis* para producir plantas de la descendencia; y seleccionando entre las plantas de la descendencia una planta que comprende en su genoma ácido nucleico introgresado a partir de dicha planta donadora de tomate, en el que dicho ácido nucleico introgresado comprende, como mínimo, un QTL para resistencia a *Botrytis* según la presente invención, o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis*. La presencia en dicho ácido nucleico introgresado, como mínimo, de un QTL para resistencia a *Botrytis* según la presente invención, o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis*, puede detectarse adecuadamente mediante un método en el que se detecta, como mínimo, un marcador seleccionado entre el grupo que comprende los marcadores de las tablas 1 y 2 y los marcadores tal como se indican en las figuras 1, 5 y 6 ligados a un QTL para resistencia a *Botrytis*.

Un método de selección preferente comprende, por lo tanto, selección asistida por marcadores (MAS) (véase, por ejemplo, Tanksley y otros 1998) de dicho ADN introgresado en el que uno o más marcadores asociados con dicho QTL se detectan en plantas de la descendencia. La MAS puede realizarse, por ejemplo, aislando material genético a partir de dichas plantas de la descendencia y determinando la presencia en su interior, mediante técnicas moleculares, de uno o más marcadores de la planta donadora. Como alternativa, pueden utilizarse métodos de detección de marcadores moleculares sin aislamiento anterior de material genético. Opcionalmente, además de la detección de marcadores, puede realizarse un ensayo fenotípico sobre resistencia a *Botrytis* para seleccionar plantas adecuadas. Un ensayo muy adecuado es, por lo tanto, el bioensayo cuantitativo tal como se describe en el presente documento, con lo cual se determinan parámetros tales como la incidencia de la enfermedad y/o la tasa de crecimiento de la lesión. La confirmación de la presencia, como mínimo, de un marcador de un QTL para resistencia a *Botrytis* en combinación con el establecimiento de la presencia de un fenotipo resistente proporciona evidencias para la transferencia con éxito de ácido nucleico que comprende, como mínimo, un QTL o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis*, de la planta donadora a la planta receptora.

En un método de producción de una planta de tomate resistente a *Botrytis*, la transferencia indicada de ácido nucleico se realiza mediante métodos transgénicos (por ejemplo mediante transformación), mediante fusión de protoplastos, mediante una técnica de dobles haploides o mediante rescate de embriones.

En una realización preferente de un método de producción de una planta de tomate resistente a *Botrytis*, la planta donadora es *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 y el ácido nucleico transferido desde esta planta donadora a plantas receptoras de *L. esculentum* preferentemente comprende el QTL para resistencia a *Botrytis* que es el QTL en el cromosoma 4 (QTL-4h) de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 asociado con resistencia a *Botrytis* en el que dicha transferencia no implica procesos esencialmente biológicos.

Se describe, además, un método de producción de una planta de tomate resistente a *Botrytis*, el método comprende el cruzamiento de dicha planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* con una planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis* para producir plantas de la descendencia de primera generación; seleccionar entre las plantas de la descendencia de primera generación una planta que comprende en su genoma ácido nucleico introgresado desde dicha planta donadora de tomate, en el que dicho ácido nucleico introgresado comprende, como mínimo, un QTL, preferentemente dos, más preferentemente más de dos QTL para resistencia a *Botrytis* o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis*; cruzar dicha planta de la descendencia seleccionada con una línea de tomate comercial adecuada para producir plantas de la descendencia de segunda generación; seleccionar entre las plantas de la descendencia de segunda generación una planta que comprende en su genoma ácido nucleico introgresado de dicha planta de tomate de descendencia de primera generación, en el que dicho ácido nucleico introgresado comprende, como mínimo, un QTL, preferentemente dos, más preferentemente más de dos QTL para resistencia a *Botrytis* o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis*, y opcionalmente producir generaciones adicionales de plantas de la descendencia. Los mencionados preferentemente dos, más preferentemente más de dos QTL para resistencia a *Botrytis* que están introgresados en plantas de la descendencia pueden ser QTL para incidencia de la enfermedad, QTL para tasa de crecimiento de la lesión o una combinación de estos tipos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una planta de tomate de *L. esculentum* resistente a *Botrytis*, o parte de la misma, que puede obtenerse mediante un método descrito en el presente documento.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a una planta de tomate de *L. esculentum* resistente a *Botrytis*, o parte de la misma, que comprende dentro de su genoma, como mínimo, un QTL, en la que dicho QTL es el QTL en el cromosoma 4 de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 asociado con resistencia a *Botrytis*, y en la que dicho QTL o dicha parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis* no está en su contexto genético natural.

Se describe, además, un método de producción de una planta de tomate endogámica resistente a *Botrytis*. El método comprende las etapas de producir una planta de tomate resistente a *Botrytis* según un método tal como se ha descrito, autofertilizar dicha planta, cultivar la semilla obtenida de dicha planta autofertilizada en nuevas plantas; identificar plantas que muestran resistencia a *Botrytis* y poseen características deseables desde el punto de vista comercial entre dichas nuevas plantas, y repetir las etapas de autofertilización y selección hasta que se produzca una planta de tomate endogámica que muestre resistencia a *Botrytis* y posea características deseables desde el punto de vista comercial.

Un método de producción de una planta de tomate de *L. esculentum* endogámica resistente a *Botrytis* puede comprender, además, la etapa adicional de seleccionar plantas de tomate endogámicas homocigóticas que muestran resistencia a *Botrytis* y poseen características deseables desde el punto de vista comercial.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una planta de tomate de *L. esculentum* endogámica resistente a *Botrytis*, o partes de la misma, que pueden obtenerse mediante un método tal como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una planta de tomate de *L. esculentum* híbrida, o partes de la misma, que muestra resistencia a *Botrytis*, en la que dicha planta de tomate híbrida puede obtenerse cruzando una planta de tomate de *L. esculentum* endogámica resistente a *Botrytis* que puede obtenerse mediante un método tal como se ha descrito con una planta de tomate de *L. esculentum* endogámica que muestra características deseables desde el punto de vista comercial.

Se describe, además, un cultivo tisular de células regenerables de las plantas de tomate de la presente invención. En una realización preferente de dicho cultivo tisular, las células o protoplastos de dichas células que han sido aisladas de un tejido seleccionado entre el grupo que comprende hojas, polen, embriones, raíces, ápices radiculares, anteras, flores, frutos, y tallos y semillas.

La presente invención se refiere, además, a la utilización de un marcador, según la reivindicación 1, para la detección de plantas de tomate resistentes a *Botrytis*.

La planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* utilizada en métodos de la presente invención se selecciona preferentemente entre el grupo que comprende *Lycopersicon cerasiforme*, *Lycopersicon cheesmanii*, *Lycopersicon chilense*, *Lycopersicon chmielewskii*, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon hirsutum*, *Lycopersicon parviflorum*, *Lycopersicon pennellii*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lycopersicon pimpinellifolium* y *Solanum lycopersicoides*, más preferentemente, se utiliza un número de registro de adquisiciones de *Lycopersicon silvestre* como planta donadora.

Las plantas donadoras altamente preferentes son *Lycopersicon hirsutum* y *Lycopersicon parviflorum*, en particular *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 y *Lycopersicon parviflorum* G1.1601.

La planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis* utilizada en métodos tal como se han descrito es, preferentemente, una planta de la especie *Lycopersicon esculentum*, más preferentemente, una variedad cultivada de *L. esculentum* que posee características deseables desde el punto de vista comercial, u otra línea de tomate comercial.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la posición de loci de rasgo cuantitativo (QTL) para resistencia a *B. cinerea* originarios de *L. hirsutum* LYC 4/78 con los mapas de ligamiento que representan al cromosoma 1 y 2. Las posiciones en el mapa se dan en cM. El QTL detectado en el cromosoma 1 es para crecimiento de la lesión y el QTL detectado en el cromosoma 2 es para incidencia de la enfermedad. Las barras indican los intervalos de QTL. El recuadro muestra el intervalo LOD 1 y la línea muestra el intervalo LOD 2. Los códigos para marcadores AFLP se describen de forma más exhaustiva en la tabla 1.

La figura 2 muestra una visión general esquemática del desarrollo de las poblaciones de *L. esculentum* x *L. hirsutum* LYC 4/78. Las líneas BC₄ se retrocruzan con *L. esculentum* cv. Moneymaker para obtener líneas BC₅ para ayudar al desarrollo de líneas QTL-NIL para los dos efectos principales, que se identificaron en la población F₂. Las líneas BC₃ y BC₄ se retrocruzan con *L. esculentum* cv. Moneymaker para obtener una población de línea endogámica de retrocruzamiento (BIL) (véase el ejemplo 3).

La figura 3 muestra la segregación en las dos poblaciones BC₂S₁ (tamaño de población 60 resp. 47) que segregan para crecimiento de la lesión (figura 3B y 3D e incidencia de la enfermedad (figura 3A y 3C). El crecimiento de la lesión está en el eje x en mm (figura 3B y 3D) y las clases son 0,5 mm (2,75-3,25; 3,25-3,75 y así sucesivamente) y la incidencia de la lesión (figura 3A y 3C) está en clases del 5% (12,5 - 17,5%; 17,5-22,5% y así sucesivamente). En el eje y está el número de plantas en cada clase. Los valores parentales promedio se indican mediante las flechas para MM resp. Lyc 4/78.

La figura 4 muestra los resultados del cruce de *L. esculentum* cv. Moneymaker x *L. parviflorum* G1.1601. La segregación en la población F₂ (en base al promedio de las líneas F₃) para incidencia de la enfermedad (figura 4A) y crecimiento de la lesión (figura 4B). La incidencia de la enfermedad está en el eje x como un porcentaje (figura 4A) y clases del 5% (12,5 - 17,5%; 17,5-22,5% y así sucesivamente. El crecimiento de la lesión está en el eje x en mm (figura 4B) y las clases son 0,5 mm (2,75-3,25; 3,25-3,75 y así sucesivamente). En el eje y, se presenta el número de plantas en cada clase.

La figura 5 muestra un mapa de ligamiento de los QTL de *L. parviflorum* tal como se describe en el presente documento. El QTL-3p está ubicado en la región indicada por los marcadores P15M48-234, P18M50-167, TG599, P18M51-486, P22M50-151 y P14M60-65. El QTL-4p está ubicado en la región indicada por los marcadores P14M48-158 y P14M48-34xCD (= P14M48-349 en la tabla 2). El QTL-9p está ubicado en la región indicada por los marcadores TG10, P22M50-56, P14M48-56, P14M50-82, P14M50-204, P15M48-138 (= P15M48-137 en la tabla 2), P14M50-174 (=P14M50-176 en la tabla 2), P22M51-201, P15M48-54, TM2a, P22M51-165, P14M48-120, TG551, P15M48-15xCD (= P15M48-155 en la tabla 2).

La figura 6 muestra un mapa de ligamiento y representaciones gráficas de QTL de los QTL de *L. hirsutum* tal como se describe en el presente documento. El mapa es una actualización del de la figura 1, que muestra las regiones genómicas más claramente. Todos los marcadores que indicaban como asociados a QTL-4h aquellos que van desde TG339 a T1405, e incluyendo el mismo en C4) pueden utilizarse como marcadores en aspectos de la presente invención. Esta versión actualizada proporciona la base para realizaciones preferentes en aspectos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Los encabezados que se dan a conocer en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la presente invención que pueden tenerse como referencia a la memoria descriptiva como un todo. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente en referencia a la memoria descriptiva como un todo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "*Botrytis*" significa *Botrytis cinerea*, también conocido como moho gris o podredumbre gris, una enfermedad que se encuentra habitualmente en el tallo, las hojas y el fruto de los tomates. Se considera generalmente que el hongo patógeno de plantas *Sclerotinia sclerotiorum* tiene un mecanismo de infección similar al de *B. cinerea* (Prins y otros, 2000). Aunque la infección por *S. sclerotiorum* en tomate es económicamente mucho menos importante que la infección por *B. cinerea*, ambos hongos secretan un espectro de proteasas, enzimas que degradan la pared celular vegetal, toxinas, así como ácido oxálico. Se sabe que algunos de estos factores desempeñan un papel en la estrategia de infección de ambos hongos. Como resultado, se cree que los mecanismos y genes que otorgan resistencia a *Botrytis* son igualmente efectivos para proporcionar resistencia a la infección por *S. sclerotiorum*. Por lo tanto, cuando en el presente documento se hace referencia a "resistencia a

Botrytis", debe entenderse que dicha resistencia incluye resistencia a cualquier hongo de la familia *Sclerotiniaceae*, preferentemente resistencia a *S. sclerotiorum* y *B. cinerea*, más preferentemente resistencia a *B. cinerea*.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alelo" o "alelos" significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen, alelos todos los cuales se refieren, como mínimo, a un rasgo o característica. En una célula u organismo diploide, los dos alelos de un gen dado ocupan loci correspondientes en un par de cromosomas homólogos. Dado que el presente documento describe QTL, es decir regiones genómicas que pueden comprender uno o más genes, pero también secuencias reguladoras, en algunos casos es más preciso referirse a "haplotipo" (es decir un alelo de un segmento cromosómico) en lugar de "alelo", sin embargo, en esos casos, debe entenderse que el término "alelo" comprende el término "haplotipo".

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

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

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heterocigótico" significa una condición genética que existe cuando alelos diferentes residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "homocigótico" significa una condición genética que existe cuando alelos idénticos residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "híbrido" significa cualquier descendencia de un cruce entre dos individuos genéticamente diferentes, incluyendo aunque sin limitarse al cruce entre dos líneas endogámicas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "endogámico/a" significa un individuo o línea sustancialmente homocigótica

30 En la presente solicitud se entiende que un "evento de recombinación" significa un sobrecruzamiento meiótico.

35 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "introgresión", "introgresado" e "introgresar" se refieren a procesos tanto naturales como artificiales con lo cual genes de una especie, variedad o variedad cultivada se mueven al genoma de otra especie, variedad o variedad cultivada, cruzando esas especies. El proceso puede completarse opcionalmente mediante retrocruzamiento con el parental recurrente.

40 "Ingeniería genética", "transformación" y "modificación genética" se utilizan todos en el presente documento como sinónimos para la transferencia de genes aislados y clonados en el ADN, habitualmente el ADN o genoma cromosómico, de otro organismo.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "marcador molecular" se refiere a un indicador que se utiliza en métodos para visualizar diferencias de características de secuencias de ácido nucleico. Son ejemplos de dichos indicadores marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), marcadores microsátélites (por ejemplo SSR), marcadores de región amplificada caracterizada por secuencia (SCAR), marcadores de secuencia polimórfica amplificada escindida (CAPS) o marcadores de isozima o combinaciones de los marcadores descritos en el presente documento que define una ubicación genética y cromosómica específica.

50 Los términos "resistente" y "resistencia" abarcan resistencia tanto parcial como completa a la infección. Una planta de tomate susceptible a *Botrytis* puede ser no resistente o tener niveles bajos de resistencia a infección por *Botrytis*.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "parte de la planta" indica una parte de la planta de tomate, que incluye células individuales y tejidos celulares tales como células vegetales que están intactas en las plantas, masas de células y cultivos tisulares a partir de los cuales pueden regenerarse plantas de tomate. Los ejemplos de partes de la planta incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, células individuales y tejidos de polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, ápices radiculares, anteras, flores, frutos, tallos, brotes y semillas; así como polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, ápices radiculares, anteras, flores, frutos, tallos, brotes, esquejes, rizomas, semillas, protoplastos, callos y similares.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "población" significa una colección genéticamente heterogénea de plantas que comparten una derivación genética común.

65 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tomate" significa cualquier planta, línea o población de *Lycopersicon* incluyendo aunque sin limitarse a las mismas *Lycopersicon cerasiforme*, *Lycopersicon cheesmanii*,

Lycopersicon chilense, *Lycopersicon chmielewskii*, *Lycopersicon esculentum* (o *Solanum lycopersicum*), *Lycopersicon hirsutum*, *Lycopersicon parviflorum*, *Lycopersicon pennellii*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lycopersicon pimpinellifolium* o *Solanum lycopersicoides*. Aunque Linneo clasificó en primer lugar el tomate moderno como un *Solanum*, su nombre científico durante muchos años ha sido *Lycopersicon esculentum*. Análogamente, los parientes silvestres del tomate moderno han sido clasificados en el género *Lycopersicon*, como *L. pennellii*, *L. hirsutum*, *L. peruvianum*, *L. chilense*, *L. parviflorum*, *L. chmielewskii*, *L. cheesmanii*, *L. cerasiforme* y *L. pimpinellifolium*. Durante los últimos años, se ha producido un debate entre los investigadores y botánicos que trabajan con tomate sobre si reclasificar los nombres de estas especies. El nombre científico recientemente propuesto para el tomate moderno es *Solanum lycopersicum*. Análogamente, los nombres de las especies silvestres pueden alterarse. *L. pennellii* puede convertirse en *Solanum pennellii*, *L. hirsutum* puede convertirse en *S. habrochaites*, *L. peruvianum* puede dividirse en *S. 'N peruvianum'* y *S. 'Callejon de Huayles'*, *S. peruvianum*, y *S. corneliomuelleri*, *L. parviflorum* puede convertirse en *S. neorickii*, *L. chmielewskii* puede convertirse en *S. chmielewskii*, *L. chilense* puede convertirse en *S. chilense*, *L. cheesmaniae* puede convertirse en *S. cheesmaniae* o *S. galapagense*, y *L. pimpinellifolium* puede convertirse en *S. pimpinellifolium* (Solanacea Genome Network (2005) Spooner y Knapp; http://www.sgn.cornell.edu/help/about/solanum_nomenclature.html)

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “variedad” o “variedad cultivada” significa un grupo de plantas similares que, mediante características estructurales o genéticas y/o rendimiento, pueden distinguirse de otras variedades dentro de la misma especie.

El término “QTL” se utiliza en el presente documento en su significado reconocido en la técnica. La expresión “QTL asociado con resistencia a *B. cinerea* en tomate” así como la expresión más corta “QTL para resistencia a *Botrytis*” se refieren a una región ubicada en un cromosoma particular de tomate que está asociado, como mínimo, con un gen que codifica resistencia a *Botrytis* o, como mínimo, una región reguladora, es decir una región de un cromosoma que controla la expresión de uno o más genes implicados en resistencia a *Botrytis*. La expresión fenotípica de ese gen puede observarse, por ejemplo, como una tasa de crecimiento de la lesión reducida y/o como una incidencia de la enfermedad reducida. Un QTL puede comprender, por ejemplo, uno o más genes cuyos productos otorgan la resistencia genética. Como alternativa, un QTL puede comprender, por ejemplo, genes o secuencias reguladoras cuyos productos influyen en la expresión de genes en otros loci en el genoma de la planta otorgando de este modo la resistencia a *Botrytis*. Los QTL pueden definirse indicando su ubicación genética en el genoma del número de registro de adquisiciones silvestre de *Lycopersicon* respectivo utilizando uno o más marcadores genómicos moleculares. Uno o más marcadores, a su vez, indican un locus específico. Las distancias entre loci se miden habitualmente mediante la frecuencia de sobrecruzamiento entre loci en el mismo cromosoma. Cuanto más alejados estén dos loci, más probable será que se produzca un sobrecruzamiento entre ellos. A la inversa, si dos loci están muy juntos, es menos probable que se produzca un sobrecruzamiento entre ellos. Como norma, un centimorgan (cM) es igual a un 1% de recombinación entre loci (marcadores). Cuando un QTL puede estar indicado por múltiples marcadores, la distancia genética entre los marcadores de punto final es indicativa del tamaño del QTL.

La expresión “planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis*” se utiliza en el presente documento para indicar una planta de tomate que recibirá ADN obtenido de una planta de tomate donadora que comprende un QTL para resistencia a *Botrytis*. Dicha “planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis*” puede comprender ya o no uno o más QTL para resistencia a *Botrytis*, en cuyo caso la expresión indica una planta que recibirá un QTL adicional.

La expresión “contexto genético natural” se utiliza en el presente documento para indicar el contexto genético original de un QTL. Dicho contexto puede ser, por ejemplo, el genoma de un número de registro de adquisiciones silvestre de resistencia a *Botrytis* de tomate. Por ejemplo, los QTL se descubrieron en ubicaciones específicas en los cromosomas 1, 2 y 4 de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 y los cromosomas 3, 4 y 9 de *Lycopersicon parviflorum* G1.1601. Como ejemplo, el *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 representa el contexto genético natural de los QTL en los cromosomas 1, 2 y 4 de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78. Además el *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 representa el contexto genético natural de dichos QTL. A la inversa, un método que implica la transferencia de ADN que comprende el QTL, o una parte del mismo que otorga resistencia, de los cromosomas 1 de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 a la misma posición en el cromosoma 1 de otra especie de tomate, dará como resultado que ese QTL, o dicha parte del mismo que otorga resistencia, no esté en su contexto genético natural.

La expresión “incidencia de la enfermedad” se define en el presente documento como el parámetro que refleja la capacidad de la planta para reducir el establecimiento de una infección y puede establecerse, por ejemplo, determinando el éxito de conseguir infección de la planta después del contacto con el agente infeccioso.

Las dos expresiones para “tasa de crecimiento de la lesión” se definen en el presente documento como el parámetro que refleja la capacidad de la planta para ralentizar o reducir el avance de la infección, y puede establecerse, por ejemplo, determinando la tasa de crecimiento de lesiones en expansión.

La expresión “determinar cuantitativamente” se define en el presente documento como establecer o evaluar de una manera que implica medición, en particular la medición de aspectos medibles en términos de cantidades y número. Las determinaciones en grados de gravedad e indicaciones de mayor, más, menos o igual o de magnitud creciente o decreciente, no están comprendidas en la presente expresión “determinar cuantitativamente”, expresión que en

último término implica la presencia de un mecanismo de recuento objetivo para determinar valores absolutos. Por lo tanto “determinar cuantitativamente la incidencia de la enfermedad y/o la tasa de crecimiento de la lesión” preferentemente comprende determinar el porcentaje de todos los contactos potencialmente infecciosos entre planta y agente infeccioso que dan como resultado lesiones medibles (para evaluar la incidencia de la enfermedad), y/o determinar el aumento de diámetro, circunferencia, área superficial o volumen de una o más de dichas lesiones con el tiempo en condiciones favorables para el crecimiento fúngico (para evaluar la tasa de crecimiento de lesiones).

La expresión “condiciones de práctica estándar”, “condiciones de invernadero estándar” y “condiciones estándar” se refieren a las condiciones de luz, humedad, temperatura, etc., a las que se cultivan o incuban las plantas, por ejemplo para los fines de caracterización fenotípica de resistencia a enfermedades, siendo estándar. Para invernaderos por ejemplo, esto se refiere a 16-horas día, 15°C-25°C. Más en general, las expresiones se refieren a condiciones de crecimiento estándar y de referencia con un fotoperiodo de 8 a 24 horas (flujo de fotones fotosintéticos (PPF) de 50 a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), preferentemente un régimen de luz de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, una temperatura del aire de aproximadamente 19°C durante el día y 15°C de noche, un déficit de presión de vapor de agua de aproximadamente 4,4 g m^{-3} correspondiente a una humedad relativa (HR) de aproximadamente el 60%-85%, una concentración de CO_2 y O_2 atmosférico de 600-700 ppm y una presión de aire atmosférico (generalmente 1008 hPa). El agua y los nutrientes pueden administrarse gota a gota cerca del tallo, o en forma de pulverización o niebla. Las condiciones de experimentación del bioensayo estándar, tales como ensayo de longitud de la lesión del tallo, mediciones de incidencia de la enfermedad y tasa de crecimiento de la lesión, se especifican adicionalmente en los ejemplos a continuación. En más detalle, el ensayo de la longitud de la lesión del tallo promedio se realizará tal como se describe en los ejemplos 3.10 y 3.11.

Identificación de QTL asociados con resistencia a *Botrytis* en tomate

Es conocido que las especies silvestres de *Lycopersicon* proporcionan fuentes adecuadas para rasgos de resistencia a enfermedades y plagas y se ha documentado la presencia de resistencia parcial a *B. cinerea* en las hojas de especies silvestres de *Lycopersicon* (Urbasch, 1986). Dos factores han dificultado la obtención para resistencia a *B. cinerea* en tomate en el pasado. En primer lugar, el cruzamiento de resistencia parcial en líneas de obtención comerciales ha tenido un éxito limitado. En segundo lugar, faltaron ensayos de enfermedad fiables y reproducibles que permitieran la identificación y localización del material genético responsable de otorgar resistencia.

Urbasch (Urbasch, 1986), por ejemplo, infectó hojas con micelio utilizando tapones de agar proporcionando al hongo un exceso de nutrientes, lo que afectaba fuertemente al proceso de infección. Otros investigadores han utilizado índices de enfermedad de la planta subjetivos, que no son adecuados para el análisis cuantitativo requerido para la identificación de loci de rasgo cuantitativo (QTL).

La infección por *Botrytis cinerea* en *Lycopersicon esculentum* en condiciones de laboratorio está relativamente bien estudiada (por ejemplo Benito y otros, 1998). La inoculación con gotas de las hojas y la posterior incubación a temperaturas moderadas (15-20°C) da como resultado un rápido (16-24 horas postinfección (hpi)) desarrollo de puntos necróticos en el sitio del inóculo. La infección está limitada temporalmente a este punto durante aproximadamente 48 horas. Desde ese momento en adelante, una proporción de las lesiones (habitualmente el 5-10%) comienza a expandirse. El crecimiento hacia el exterior de estas llamadas “lesiones en expansión” está acompañado por un aumento de la biomasa del hongo y da como resultado la colonización de la hojuela completa en las siguientes 48 horas.

Los inventores de la presente invención descubrieron que QTL específicos asociados con resistencia a *Botrytis* en tomate pueden identificarse cuando se utiliza un bioensayo para medir la resistencia, en el que la velocidad del avance de la infección y/o el éxito de alcanzar infección después del contacto con el agente infeccioso se miden cuantitativamente en partes de la planta de tomate, preferentemente en partes desprendidas, más preferentemente en segmentos del tallo. Se descubrió sorprendentemente que múltiples QTL para resistencia a *Botrytis* estaban presentes en los genomas de plantas de tomate resistentes a *Botrytis*, mientras que los métodos de la técnica anterior dieron como resultado la identificación tentativa de solamente un único QTL para resistencia a *Botrytis*. Además, los QTL que se descubrieron utilizando estos métodos estaban ubicados en cromosomas no asociados previamente con resistencia a *Botrytis* de plantas de tomate y los QTL estaban asociados con diversas manifestaciones fenotípicas de resistencia. Por lo tanto, los métodos tal como se describen en el presente documento han proporcionado la nueva percepción de que la base genética de la resistencia a *Botrytis* en tomate es poligénica.

Por ejemplo, se descubrió que las regiones genéticas presentes en el cromosoma 2 y 4 de *L. hirsutum* LYC 4/78 eran responsables de una incidencia de la enfermedad reducida, mientras que una región genética presente en el cromosoma 1 era, como mínimo, parcialmente responsable de una tasa de crecimiento de lesiones reducida. Se descubrió que existen regiones genéticas similares ligadas a estos fenotipos en *L. parviflorum* G1.1601, aunque éstas no estaban necesariamente ubicadas en el mismo cromosoma.

Se descubrió, además, que las nuevas regiones de QTL estaban asociadas con niveles más elevados de resistencia que las asociadas con el QTL en el cromosoma 10 de la técnica anterior. Por lo tanto, el método tal como se ha

descrito es capaz de descubrir principales QTL para resistencia a *Botrytis* que otorgan un nivel de resistencia a la planta que es más elevado que el alcanzado previamente. Por lo tanto, una ventaja del método es que da como resultado el descubrimiento de QTL que están asociados con niveles más elevados de resistencia a *Botrytis*. Este nivel de resistencia puede determinarse mediante cualquier método disponible, tal como utilizando los métodos tal como se han descrito o utilizando métodos convencionales de la técnica anterior. Una descripción detallada de la configuración y las condiciones experimentales se dan a conocer en los ejemplos más adelante.

Un método para detectar un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con resistencia a *Botrytis* en tomate, abordable de otro modo como método para identificar o localizar un locus de rasgo cuantitativo (QTL), requiere la disponibilidad de una planta de tomate (parcialmente) resistente a *Botrytis*. Dicha planta puede proporcionarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, y utilizando cualquier método para la determinación de la presencia de dicha resistencia (parcial) en dicha planta. La provisión de una planta de tomate (parcialmente) resistente a *Botrytis* (que servirá además como planta donadora en un método tal como se describe) permite el establecimiento o provisión de marcadores cromosómicos, preferentemente marcadores AFLP, CAPS y/o SCAR, de la forma más preferente marcadores CAPS y/o SCAR, para como mínimo uno, pero preferentemente para todos los cromosomas de dicha planta. Estableciendo una colección de marcadores cromosómicos en toda la longitud de dichos cromosomas, las diversas ubicaciones de dichos cromosomas pueden marcarse eficazmente. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica y métodos ejemplares se describirán con más detalle más adelante en el presente documento.

Un método para detectar un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con resistencia a *Botrytis* en tomate comprende, como primera etapa, el cruzamiento de dicha planta de tomate donadora (parcialmente) resistente a *Botrytis* con una planta de tomate receptora no resistente o susceptible a *Botrytis* para producir plantas de la descendencia. Posteriormente una o más plantas de la descendencia se ponen en contacto con una cantidad infectante de *Botrytis*. Dicha cantidad puede variar entre plantas y entre especies de hongos ensayadas. Habitualmente una cantidad de aproximadamente 1 a 10 a una cantidad de aproximadamente 500-5000 conidios de dicho hongo será suficiente.

Una etapa posterior comprende determinar cuantitativamente la incidencia de la enfermedad y/o la tasa de crecimiento de lesiones en una o más plantas de la descendencia producidas a partir de dicho cruce. Dicha determinación cuantitativa se realiza, preferentemente, en múltiples plantas de la descendencia. Las plantas de la descendencia son, preferentemente, plantas de la población F₂ derivadas de un cruce entre una planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* y una planta de tomate receptora no resistente o susceptible a *Botrytis*. Preferentemente, como descendencia, se utiliza una población F₂ segregante, más preferentemente, una población F₂ derivada de un cruce entre *L. esculentum* cv. Moneymaker y *L. hirsutum* LYC 4/78. En la práctica, la semilla de F₁ derivada de dicho cruce puede haberse cultivado en plantas F₁ donde después una única planta F₁ se autofertiliza a continuación para producir la semilla F₂ de la cual las plantas F₂ derivadas posteriormente se utilizan para la determinación de la incidencia de la enfermedad y/o la tasa de crecimiento de lesiones en un método tal como se ha descrito. Como alternativa, pueden utilizarse líneas F₃ para ensayos de resistencia.

La etapa de poner en contacto una o más plantas de la descendencia con una cantidad infectante de *Botrytis* y determinar cuantitativamente la incidencia de la enfermedad y/o la tasa de crecimiento de lesiones en dichas una o más plantas de la descendencia se realiza preferentemente como parte de un bioensayo de resistencia en segmentos del tallo u hojas, tal como se describe en el presente documento, preferentemente un bioensayo de resistencia en segmentos del tallo. El experto en la materia entenderá que son posibles variaciones a estos ensayos tal como se describe más adelante en el presente documento.

Un bioensayo de resistencia en segmentos del tallo puede realizarse esencialmente de la siguiente manera: En primer lugar, semillas para las plantas de la descendencia se plantan y se cultivan a plantones/plantas, de forma adecuada, aproximadamente de 50 cm de altura. Los 5-10 cm superiores y los 5-10 cm inferiores del tallo de las plantas pueden eliminarse y los 30 cm restantes pueden cortarse en segmentos iguales de 5-6 cm. Los segmentos del tallo se colocan preferentemente erguidos en un enrejado con la base del tallo en papel de filtro húmedo. Antes de la inoculación, los segmentos del tallo se pulverizan adecuadamente con agua para garantizar una extensión igual del inóculo por la superficie de la herida. Cada segmento del tallo puede inocularse a continuación mediante una suspensión conidial de *B. cinerea*. Una cantidad adecuada de inóculo, por ejemplo una gota de aproximadamente 5 µl, que comprende aproximadamente 10⁶ conidios · ml⁻¹, puede aplicarse en la parte superior de cada segmento del tallo. Los segmentos del tallo se incuban a continuación a una temperatura, de forma adecuada, de aproximadamente 16°C, preferentemente en la oscuridad, y preferentemente a una alta humedad (por ejemplo 100% de HR). El avance de la infección puede determinarse cuantitativamente midiendo el avance máximo del síntoma de podredumbre en diversos intervalos de tiempo después de la inoculación con un calibre de Vernier. A una serie de intervalos de tiempo adecuados, por ejemplo a las 96, 120 y 144 horas postinfección (hpi), los tallos pueden ser inspeccionados a continuación en busca de la formación de lesiones (incidencia de la enfermedad) y crecimiento de las lesiones, de manera cuantitativa. Parámetros muy adecuados comprenden la medición del tamaño de la lesión, por ejemplo utilizando un calibre. Para corregir la variación causada por la estación o el cultivo de las plantas, las mediciones cuantitativas de los bioensayos pueden relacionarse con las mediciones comparables en líneas de control o de referencia susceptibles. La incidencia de la enfermedad puede determinarse

adecuadamente dividiendo el número total de lesiones en expansión por el número total de gotas de inoculación. La proporción de lesiones en expansión en un genotipo particular puede dividirse a continuación por la proporción de lesiones en expansión observadas en un genotipo de control o de referencia y expresarse como un porcentaje. Como alternativa, o adicionalmente, las tasas de crecimiento de la lesión pueden determinarse calculando el aumento del tamaño de la lesión (por ejemplo en mm) durante un periodo adecuado, por ejemplo durante un periodo de 24 horas. Los datos para las lesiones no en expansión pueden borrarse del análisis cuantitativo. La tasa de crecimiento de la lesión obtenida puede dividirse a continuación opcionalmente por la tasa de crecimiento de la lesión observada en un genotipo de control o de referencia y expresarse como un porcentaje o como una cifra absoluta, por ejemplo en milímetros.

Como alternativa, las plantas pueden cribarse utilizando un bioensayo de infección de la hoja de la siguiente manera: en primer lugar, se plantan semillas de tomate y se cultivan a plántones/plantas. Para cada planta individual una o dos hojas compuestas pueden cortarse del tallo principal y transferirse a espuma floral previamente humedecida. La espuma floral se coloca a continuación en una placa de Petri que contiene agua corriente y posteriormente se coloca en un recipiente humedecido por pulverización que contiene papel de filtro húmedo. Un inóculo adecuado que comprende conidios de *B. cinerea* puede prepararse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo tal como describen Benito y otros, 1998. Las hojas compuestas se inoculan a continuación con la suspensión conidial de *B. cinerea* colocando una serie de gotas, adecuadamente por ejemplo de 6 a 10 gotas de 2 µl cada una, sobre la superficie superior de las hojas. El recipiente se cierra a continuación y las hojas se incuban a una temperatura de adecuadamente entre 15°C-20°C, preferentemente en la oscuridad, y preferentemente a humedad alta. En una serie de intervalos de tiempo adecuados, por ejemplo a 96, 120 y 144 hpi, las hojas pueden ser inspeccionadas a continuación para comprobar la incidencia de la enfermedad y el crecimiento de la lesión, de manera cuantitativa tal como se ha descrito anteriormente para el bioensayo del tallo.

Un método para detectar un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con resistencia a *Botrytis* en tomate tal como se ha descrito comprende, además, las etapas de establecer un mapa de ligamiento genético que liga la incidencia de la enfermedad y/o la tasa de crecimiento de lesiones observadas con la presencia de marcadores cromosómicos de dicha planta donadora de tomate en dichas una o más plantas de la descendencia y que asigna marcadores contiguos en dicho mapa que están ligados a una incidencia de la enfermedad reducida y/o una tasa de crecimiento de la lesión reducida a un locus de rasgo cuantitativo.

Un mapa de ligamiento genético que liga la incidencia de la enfermedad y/o la tasa de crecimiento de lesiones observadas con la presencia de marcadores cromosómicos de la planta de tomate donadora en dichas una o más plantas de la descendencia puede establecerse mediante cualquier método conocido en la técnica. El experto en la materia está al tanto de métodos para identificar marcadores moleculares ligados a loci de rasgo cuantitativo (QTL) de resistencia y el mapeo de estos marcadores en un mapa de ligamiento genético (véase por ejemplo Bai y otros, 2003; Foolad y otros, 2002; van Heusden y otros, 1999). La asociación entre el fenotipo resistente a *Botrytis* y el genotipo del marcador puede realizarse adecuadamente utilizando paquetes de software tales como JoinMap® y MapQTL® (véase los ejemplos) o cualquier paquete estadístico convencional que pueda realizar análisis del análisis de la varianza. Los marcadores moleculares pueden utilizarse para construir mapas de ligamiento genético y para identificar loci de rasgo cuantitativo (QTL) para resistencia a *Botrytis*. Los tipos adecuados de marcadores moleculares y métodos para obtenerlos se describen con más detalle más adelante en el presente documento.

Un método para detectar un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con resistencia a *Botrytis* en tomate puede mejorarse adicionalmente reduciendo la variación experimental en el bioensayo y/o mediante la construcción de una población endogámica de retrocruzamiento (BIL) completa. Utilizando dicha línea BIL en combinación con los métodos tal como se han descrito, la resistencia cuantitativa a *B. cinerea* puede evaluarse de forma aún más precisa y pueden identificarse QTL adicionales.

50 Marcadores moleculares y QTL

Se utilizan marcadores moleculares para la visualización de diferencias en secuencias de ácido nucleico. Esta visualización es posible debido a técnicas de hibridación de ADN-ADN (RFLP) y/o debido a técnicas que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo STS, microsatélites, AFLP). Todas las diferencias entre dos genotipos parentales segregarán en una población de mapeo (por ejemplo, BC₁, F₂; véase la figura 2) en base al cruce de estos genotipos parentales. La segregación de los diferentes marcadores puede compararse y las frecuencias de recombinación pueden calcularse. Las frecuencias de recombinación de los marcadores moleculares en diferentes cromosomas son generalmente del 50%. Entre marcadores moleculares ubicados en el mismo cromosoma, la frecuencia de recombinación depende de la distancia entre los marcadores. Una frecuencia de recombinación baja corresponde a una baja distancia entre marcadores en un cromosoma. La comparación de todas las frecuencias de recombinación dará como resultado el orden más lógico de los marcadores moleculares en los cromosomas. Este orden más lógico puede representarse en un mapa de ligamiento (Paterson, 1996). Un grupo de marcadores adyacentes o contiguos en el mapa de ligamiento que está asociado a una incidencia de la enfermedad reducida y/o una tasa de crecimiento de lesiones reducida precisa la posición de un QTL.

Después de la identificación del QTL, el efecto del QTL (la resistencia) puede confirmarse por ejemplo evaluando la resistencia a *Botrytis* en progenies BC₂S₁ que segregan para los QTL en investigación. La evaluación de la resistencia a *Botrytis* puede realizarse adecuadamente utilizando un bioensayo en tallo u hoja tal como se describe en el presente documento.

Se describen QTL para resistencia contra *Botrytis* en tomate que pueden obtenerse utilizando un método. Una característica de dichos QTL es que, cuando están presentes en las plantas, son indicativos de la presencia de una incidencia de la enfermedad reducida y/o una tasa de crecimiento de lesiones reducida después de poner en contacto a dicha planta con una cantidad infectante de material de *Botrytis*, material que puede estar provisto en cualquier forma, tal como en forma de conidios o micelio.

Se describe, además, un QTL para resistencia contra *Botrytis* en tomate, en el que dicho QTL se selecciona entre el grupo que comprende los QTL en los cromosomas 1, 2 y 4 de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 y los QTL en los cromosomas 3, 4 y 9 en *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 asociados con resistencia a *Botrytis*. Estos QTL pueden definirse o indicarse más claramente mediante los marcadores enumerados en las tablas 1 y 2 y tal como se indica en las figuras 1, 5 y 6. La tabla 1 y las figuras 1 y 6 indican los QTL descubiertos en la población F₂ derivada del cruce de *L. esculentum* cv. Moneymaker x *L. hirsutum* LYC 4/78. La tabla 2 y la figura 5 indican los QTL descubiertos en la población F₂ derivada del cruce de *L. esculentum* cv. Moneymaker x *L. parviflorum* G1.1601. En ambas tablas, la región genómica donde están ubicados los QTL se indica mediante los marcadores AFLP enumerados. Los QTL tal como se describen comprenden información genética en forma de ADN responsable de otorgar incidencia (parcial) de la enfermedad por *Botrytis* o una tasa reducida del crecimiento de la lesión por *Botrytis* en una planta de tomate. La información genética puede comprender, por ejemplo, un gen o un elemento regulador.

Tabla 1. QTL descubiertos en la descendencia de un cruce de *L. esculentum* cv. Moneymaker x *L. hirsutum* LYC 4/78 e información sobre resistencia cuantitativa relacionada.

QTL	Marcador ¹	Código ²	Cromosoma	Incidencia de la enfermedad ^{3,4}	Tamaño de las lesiones ^{3,4}	
QTL-1h para crecimiento de la lesión	P-GT 412h	M-CAT-	P22M50-412h	1	aa 50,1	aa 8,8 mm
	P-AT 349h	M-CAT-	P14M50-349h		ab 50,0	ab 7,8 mm
	P-AT 69h	M-CTC-	P14M60-69h		bb 42,8	bb 7,1 mm
	P-AT 192h	M-CAG-	P14M49-192h			
	P-AT 232h	M-CAG-	P14M49-232h			
	P-AT 260e	M-CAG-	P14M49-260e			
	P-AT 503h	M-CAT-	P14M50-503h			
	P-CT 124h	M-CAT-	P18M50-124h			
	P-AT 114h	M-CAG-	P14M49-114h			
QTL-2h para incidencia de la enfermedad	P-AT 537h	M-CTC-	P14M60-537h	2	aa 63,4	aa 7,6 mm
	P-CA 257e	M-CAC-	P15M48-257e		ab 47,1	ab 7,9 mm
	P-AT 327h	M-CAG-	P14M49-327h		bb 43,5	bb 7,8 mm
	P-AT 325h	M-CAG-	P14M49-325h			
	P-AT 286e	M-CTG-	P14M61-286e			
	P-AT 125h	M-CTG-	P14M61-125h			
	P-CT 134h	M-CCA-	P18M51-134h			
	CT128 ⁵		ídem			

QTL	Marcador ¹	Código ²	Cromosoma	Incidencia de la enfermedad ^{3,4}	Tamaño de las lesiones ^{3,4}
QTL-4h para incidencia de la enfermedad	P-CT M-CCA-170e	P18M51-169.5e	4	aa 51%	No determinado
	P-CT M-CCA-305h	P18M51-305.4h		ab 53%	
	P-AT M-CTC-263e	P14M60-262.9e		bb 42%	
	P-AT M-CTG-293h	P14M61-292.7h			
QTL-4h para incidencia de la enfermedad	TG609 ⁶	ídem P14M48-345e	4	aa 66% ab 69%	No determinado
(Ensayo basado en otros marcadores)		P14M48-177e P18M50-147e		bb 46%	

¹ nomenclatura del marcador: por ejemplo P-GT M-CAT - 412h, en el que P y M son las secuencias de cebadores o cebadores universales habituales *Pst*I y *Mse*I (Vos y otros, 1995; Bai y otros 2003) seguidas por 2 ó 3 bases selectivas extra tal como se indica mediante un código de extensión de dos dígitos. 412 es el tamaño aproximado en pares de bases del fragmento polimórfico resultante (tamaño dado \pm 2 pares de bases). El tamaño normalmente se redondea pero también puede darse en decimales. Este fragmento se amplifica en *L. esculentum* cv Moneymaker (e) o *L. hirsutum* LYC 4/78 (horas). Las secuencias de cebador y adaptador son descritas en detalle por Bai y otros 2003.

² Códigos mediante los cuales la combinación de cebadores AFLP se indica habitualmente. Para P, M véase la nomenclatura del marcador. Los códigos de extensión de dos dígitos son los siguientes: 14: AT; 15: CA; 18: CT; 22: GT; 48: CAC; 49: CAG; 50: CAT; 51: CCA; 60: CTC; 61: CTG.

³ aa, marcador homocigótico *L. esculentum*; ab, marcador heterocigótico; bb, marcador homocigótico, pariente silvestre *L. hirsutum* LYC 4/78.

⁴ La incidencia de la enfermedad y el crecimiento de la lesión se determinan utilizando métodos tal como se explica en detalle en los ejemplos.

⁵ CT128 (véase la tabla 25) es un marcador ubicado en la posición 44 cM del cromosoma 2 en el mapa de Tanksley (Tanksley y otros 1992).

⁶ TG609 (véase la tabla 20) es un marcador RFLP ubicado en la posición 38 cM del cromosoma 4 en el mapa compuesto Tomate-EXPEN 1992 en base a una población F2 de *S. lycopersicum* cv. VF36 x *S. pennellii* LA716 F2 (Tanksley y otros 1992).

De la forma más fiable, la región genómica donde está ubicado QTL-1h está situada entre los marcadores TG301 (tabla 11) y TG460.61 (tabla 12) tal como se muestra en la figura 6. Por lo tanto, cualquier marcador ubicado dentro de esa región puede utilizarse para evaluar la presencia del QTL en el genoma de una planta, así como cualquier marcador que se sabe que está ubicado en esa región en base a información disponible públicamente, tal como de los mapas de consenso Tomato-EXPEN 1992 (Tanksley y otros, 1992), Tomato-EXHIR 1997 (Bernacchi y Tanksley, 1997), Tomato-EXPEN 2000 (Fulton y otros, 2002) o Tomato-EXPIMP 2001 (Grandillo y Tanksley, 1996; Tanksley y otros 1996, Doganlar y otros 2002). Las regiones más preferentes se indican mediante una barra en la figura 6.

De la forma más fiable, la región genómica donde está ubicado QTL-2h está situada entre los marcadores TG145 (tabla 15) y At5g64670 (tabla 19) tal como se muestra en la figura 6. Por lo tanto, cualquier marcador ubicado dentro de esa región puede usarse para evaluar la presencia del QTL en el genoma de una planta, así como cualquier marcador que se sabe que está ubicado en esa región en base a información disponible públicamente. Las regiones más preferentes se indican mediante una barra en la figura 6.

De la forma más fiable, la región genómica donde QTL-4h está ubicado está situada entre los marcadores TG609 (tabla 20) y C2Atlg74970 (tabla 24) tal como se muestra en la figura 6. Por lo tanto, cualquier marcador ubicado dentro de esa región puede utilizarse para evaluar la presencia del QTL en el genoma de una planta, así como cualquier marcador que se sabe que está ubicado en esa región en base a información disponible públicamente.

Tabla 2. QTL descubiertos en descendencia de un cruce de *L. esculentum* cv. Moneymaker x *L. parviflorum* G1.1601 e información de resistencia cuantitativa relacionada.

QTL	Marcador ¹	Código ²	Cromosoma	Incidencia de la enfermedad ³ (nº de individuos)	Tamaño de las lesiones
QTL-3p para incidencia de la enfermedad	P-CA 234p	M-CAC-	P15M48-234p	aa 70% (12) b- 49% (87)	aa 5,7 mm b- 5,1 mm
	P-CT 486p	M-CCA-	P18M51-486p		
	P-AT 65p	M-CTC-	P14M60-65p		
QTL-4p para incidencia de la enfermedad	E-AGA 115p	M-CAT-	E39M50-115p	aa 58% (17) b- 45% (76)	aa 5,9 mm b- 5,1 mm
	P-AT 158p	M-CAC-	P14M48-158p		
	P-AT 349p	M-CAC-	P14M48-349p		
QTL-9p para crecimiento de la lesión	P-AT 176p	M-CAT-	P14M50-176p	aa 49% (27) b- 51% (56)	aa 5,8 mm b- 4,9 mm
	P-CA 137p	M-CAC-	P15M48-137p		
	P-CA 155p	M-CAC-	P15M48-155p		

¹ nomenclatura del marcador: por ejemplo P-CA M-CAC - 234p, en el que P, M y E son las secuencias de cebadores o cebadores universales habituales *Pst*I, *Eco*RI y *Mse*I (Vos y otros, 1995; Bai y otros 2003) seguidas por 2 ó 3 bases selectivas extra tal como se indica. 234 es el tamaño aproximado en pares de bases del fragmento polimórfico resultante (tamaño dado ± 2 pares de bases). Este fragmento se amplifica en *L. esculentum* cv Moneymaker (e) o *L. parviflorum* G1.1601 (p). Las secuencias de cebador y adaptador son descritas en detalle por Bai y otros 2003.

² Códigos mediante los cuales la combinación cebadora AFLP se indica habitualmente. Para P, M véase la nomenclatura del marcador.

³ aa, marcador homocigótico *L. esculentum*; b-, un alelo de pariente silvestre (en este caso *L. parviflorum*) y el otro alelo puede ser *L. esculentum* o pariente silvestre.

5 De la forma más fiable, la región genómica donde está ubicado QTL-3p se indica mediante los marcadores P15M48-234, P18M50-167, TG599, P18M51-486, P22M50-151 y P14M60-65.

De la forma más fiable, la región genómica donde está ubicado QTL-4p se indica mediante los marcadores P14M48-158 y P14M48-34xCD (= P14M48-349 en la tabla 2).

10 De la forma más fiable, la región genómica donde está ubicado QTL-9p se indica mediante los marcadores TG10, P22M50-56, P14M48-56, P14M50-82, P14M50-204, P15M48-138 (= P15M48-137 en la tabla 2), P14M50-174 (= P14M50-176 en la tabla 2), P22M51-201, P15M48-54, TM2a, P22M51-165, P14M48-120, TG551, P15M48-15xCD (= P15M48-155 en la tabla 2).

15 Todos los marcadores para los QTL descubiertos en la descendencia de un cruce de *L. esculentum* cv. Moneymaker x *L. parviflorum* G1.1601 tal como se describe en el presente documento, así como cualquier marcador que se sabe que está ubicado en esa región en base a información disponible públicamente pueden utilizarse en métodos descritos en el presente documento.

20 Preferentemente, un QTL comprende, como mínimo, un marcador de la tabla 1 ó 2 o tal como se indica en las figuras 1, 5 ó 6 asociado con dicho QTL. Dado que la secuencia de ácido nucleico del QTL que es responsable de otorgar la resistencia a *Botrytis* solamente puede ser una fracción de todo el QTL identificado en el presente documento, los marcadores simplemente indican herencia ligada de regiones genéticas o la ausencia de recombinación observada dentro de dichas regiones genéticas. Por lo tanto, se observa que los marcadores
25 enumerados en las tablas 1 y 2 y tal como se indica en las figuras 1, 5 y 6 indican la región cromosómica donde está ubicado un QTL en el genoma de las líneas de *Lycopersicon* especificadas y que esos marcadores no necesariamente definen los límites de la estructura de ese QTL. Por lo tanto, la parte del QTL que comprende la secuencia o secuencias de ácido nucleico esenciales que otorgan resistencia puede ser considerablemente más
30 pequeña de lo indicado por los marcadores contiguos enumerados para un QTL particular. Dicha parte se denomina en el presente documento como una "parte que otorga resistencia" de un QTL. Como resultado, una parte que otorga resistencia de un QTL no necesita comprender necesariamente cualquiera de dichos marcadores enumerados. También otros marcadores pueden utilizarse para indicar los diversos QTL, siempre que dichos marcadores estén genéticamente ligados a los QTL y el experto en la materia puede descubrir o utilizar un QTL que

es análogo a los descritos en el presente documento, pero en el que uno o más marcadores enumerados en la tabla 1 ó 2 o indicados en las figuras 1, 5 ó 6 como estando ligados a dicho QTL están ausentes.

- 5 Una parte que otorga resistencia a *Botrytis* de un QTL para resistencia contra *Botrytis* en tomate puede identificarse utilizando una técnica de marcador molecular, por ejemplo con uno o más de los marcadores para un QTL mostrado en la tabla 1 ó 2 o indicado en las figuras 1, 5 ó 6 como que está ligado a dicho QTL, preferentemente en combinación con un bioensayo de resistencia. Las plantas de tomate que no comprenden una parte que otorga resistencia a *Botrytis* de un QTL son relativamente susceptibles a infección por *Botrytis*.
- 10 Los marcadores que se dan a conocer en el presente documento pueden utilizarse muy adecuadamente para detectar la presencia de uno o más QTL tal como se ha descrito en una planta de tomate de la que se sospecha que es resistente a *Botrytis*, y pueden utilizarse, por lo tanto, en métodos que implican obtención y selección asistidas por marcadores de plantas de tomate resistentes a *Botrytis*. Preferentemente, la detección de la presencia del QTL de la presente invención se realiza, como mínimo, con uno de los marcadores para el QTL mostrado en la tabla 1 ó 15 2 o tal como se indica en las figuras 1, 5 ó 6 estando ligados a dicho QTL. Se describe, además, un método para detectar la presencia de un QTL para resistencia a *Botrytis*, que comprende detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico de dicho QTL en una planta de tomate de la que se sospecha que es resistente a *Botrytis*, presencia que puede ser detectada mediante la utilización de dichos marcadores.
- 20 La secuencia de ácido nucleico de un QTL puede determinarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que comprende dicho QTL o una parte del mismo que otorga resistencia puede aislarse de una planta donadora resistente a *Botrytis* fragmentando el genoma de dicha planta y seleccionando aquellos fragmentos que albergan uno o más marcadores indicativos de dicho QTL. Posteriormente, o como alternativa, las secuencias del marcador (o partes de las mismas) indicativas de dicho QTL pueden utilizarse 25 como cebadores de amplificación (PCR), para amplificar una secuencia de ácido nucleico que comprende dicho QTL a partir de una muestra de ácido nucleico genómico o un fragmento del genoma obtenido de dicha planta. La secuencia amplificada puede purificarse a continuación para obtener el QTL aislado. La secuencia de nucleótidos del QTL, y/o de cualesquiera marcadores adicionales comprendidos en su interior, puede obtenerse a continuación mediante métodos de secuenciación estándar.
- 30 En el presente documento también se describe una secuencia de ácido nucleico (preferentemente ADN) aislado que comprende un QTL, o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis*. Por lo tanto, los marcadores que precisan los diversos QTL descritos en el presente documento pueden utilizarse para la identificación, el aislamiento y la purificación de uno o más genes de tomate que codifican resistencia a *Botrytis*.
- 35 La secuencia de nucleótidos de un QTL también puede, por ejemplo, resolverse determinando la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores asociados con dicho QTL y diseñando cebadores internos para dichas secuencias de marcador que pueden utilizarse a continuación para determinar además la secuencia del QTL fuera de dichas secuencias de marcador. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de los marcadores AFLP de las tablas 40 1 y 2 puede obtenerse aislando dichos marcadores a partir del gel de electroforesis utilizado en la determinación de la presencia de dichos marcadores en el genoma de una planta sujeto, y determinando la secuencia de nucleótidos de dichos marcadores mediante, por ejemplo, métodos de terminación de cadena didesoxi, bien conocidos en la técnica.
- 45 En realizaciones de dichos métodos para detectar la presencia de un QTL en una planta de tomate de la que se sospecha que es resistente a *Botrytis*, el método también puede comprender las etapas de proporcionar un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar en condiciones de hibridación restrictivas con una secuencia de ácido nucleico de un marcador ligado con dicho QTL, preferentemente seleccionado entre los marcadores de las tablas 1 y 2 y tal como se indica en las figuras 1, 5 ó 6 que está unido a dicho QTL, poner en contacto a dicho 50 oligonucleótido o polinucleótido con un ácido nucleico genómico de una planta de tomate de la que se sospecha que es resistente a *Botrytis*, y determinar la presencia de hibridación específica de dicho oligonucleótido o polinucleótido con dicho ácido nucleico genómico. Preferentemente, dicho método se realiza en una muestra de ácido nucleico obtenida de dicha planta de tomate de la que se sospecha que es resistente a *Botrytis*, aunque también pueden emplearse métodos de hibridación *in situ*. Como alternativa, y en una realización más preferente, el experto en la materia puede, una vez que se ha determinado la secuencia de nucleótidos del QTL, diseñar sondas u 55 oligonucleótidos de hibridación específicos capaces de hibridar en condiciones de hibridación restrictivas con la secuencia de ácido nucleico de dicho QTL y puede usar dichas sondas de hibridación en métodos para detectar la presencia de un QTL en una planta de tomate de la que se sospecha que es resistente a *Botrytis*.
- 60 La frase "condiciones de hibridación restrictivas" se refiere a condiciones en las que una sonda o polinucleótido hibridará con su subsecuencia diana, habitualmente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero esencialmente con ninguna otra secuencia. Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Una exhaustiva guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (Thijssen, 1993). 65 Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para ser de aproximadamente 5-10°C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. El T_m es la temperatura

(a fuerza iónica, pH, y concentración de ácido nucleico definidas) a la que el 50% de las sondas complementarias con la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (dado que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es menos de aproximadamente 1,0 M de iones de sodio, una concentración de iones de sodio (u otras sales) habitualmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es, como mínimo, de aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y, como mínimo, aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es como mínimo dos veces el fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación restrictivas ejemplares son a menudo: formamida al 50%, 5xSSC, y SDS al 1%, incubar a 42°C, o 5xSSC, SDS al 1%, incubar a 65°C, con lavado en 0,2xSSC, y SDS al 0,1% a 65°C. Para PCR, una temperatura de aproximadamente 36°C es típica para amplificación a baja restricción, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32°C y 48°C dependiendo de la longitud del cebador. Directrices adicionales para determinar los parámetros de hibridación se dan a conocer en numerosas referencias, por ejemplo Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel, y otros 1995).

“Ácido nucleico” u “oligonucleótido” o “polinucleótido” o equivalentes gramaticales utilizados en el presente documento significan, como mínimo, dos nucleótidos enlazados covalentemente juntos. Los oligonucleótidos son habitualmente de aproximadamente 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50 o hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos y polinucleótidos son polímeros de cualquier longitud, incluyendo longitudes más largas, por ejemplo, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10.000, etc. Un ácido nucleico contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, están incluidos análogos de ácido nucleico que pueden tener cadenas principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, enlaces fosforamidoato, fosforotioato, fosforoditioato, u O-metilfosforamidoato (véase Eckstein, 1991), y cadenas principales y enlaces de ácido peptidonucleico. Pueden utilizarse mezclas de ácidos nucleicos y análogos de origen natural. Análogos particularmente preferentes para oligonucleótidos son los ácidos peptidonucleicos (APN).

Producción de plantas de tomate resistentes a *Botrytis* mediante métodos transgénicos

Según otro aspecto de la presente invención, puede utilizarse una secuencia de ácido nucleico (preferentemente ADN) que comprende QTL-uh para la producción de una planta de tomate resistente a *Botrytis*. En este aspecto, la presente invención proporciona la utilización de este QTL para producir una planta de tomate de *L. esculentum* resistente a *Botrytis*, utilización que implica la introducción de una secuencia de ácido nucleico que comprende dicho QTL en una planta de tomate de *L. esculentum* receptora susceptible a *Botrytis*. Tal como se ha indicado, dicha secuencia de ácido nucleico puede derivarse de una planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* adecuada. Una planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* adecuada capaz de proporcionar una secuencia de ácido nucleico que comprende el QTL descrito anteriormente en el presente documento es *L. hirsutum* LYC 4/78. Otras plantas de tomate relacionadas que muestran resistencia a *Botrytis* y comprenden uno o más genes que codifican resistencia a *Botrytis* también pueden utilizarse como plantas donadoras resistentes a *Botrytis*, dado que, en el presente documento, se describe cómo puede identificarse este material. Otros números de registro de adquisiciones de especies de tomate que pueden examinarse en busca de resistencia a *Botrytis* incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, *Lycopersicon cerasiforme*, *Lycopersicon cheesmanii*, *Lycopersicon chilense*, *Lycopersicon chmielewskii*, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon hirsutum*, *Lycopersicon parviflorum*, *Lycopersicon pennellii*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lycopersicon pimpinellifolium* y *Solanum lycopersicoides*.

Una vez identificada en una planta de tomate donadora adecuada, la secuencia de ácido nucleico que comprende un QTL para resistencia a *Botrytis* tal como se ha descrito puede transferirse a una planta receptora adecuada mediante cualquier método disponible. Por ejemplo, dicha secuencia de ácido nucleico puede transferirse cruzando una planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* con una planta de tomate receptora susceptible (es decir mediante introgresión), mediante transformación, mediante fusión de protoplastos, mediante una técnica de dobles haploides o mediante rescate de embriones o mediante cualquier otro sistema de transferencia de ácido nucleico, opcionalmente seguido por selección de plantas de la descendencia que comprenden el QTL y que muestran resistencia a *Botrytis*. Para métodos transgénicos de transferencia, una secuencia de ácido nucleico que comprende un QTL para resistencia a *Botrytis*, o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis*, puede aislarse de dicha planta donadora utilizando métodos conocidos en la técnica y la secuencia de ácido nucleico aislada de este modo puede transferirse a la planta receptora mediante métodos transgénicos, por ejemplo por medio de un vector, en un gameto, o en cualquier otro elemento de transferencia adecuado, tal como una partícula balística recubierta con dicha secuencia de ácido nucleico.

La transformación de plantas generalmente implica la construcción de un vector de expresión que funcionará en células vegetales. Dicho vector comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende un QTL para resistencia a *Botrytis* tal como se ha descrito, vector que puede comprender un gen que otorga resistencia a *Botrytis* que está bajo el control de un elemento regulador o unido de forma operativa al mismo, tal como un promotor. El vector de expresión puede contener una o más de dichas combinaciones de gen/elemento regulador unidos de forma operativa, siempre que, como mínimo, uno de los genes contenidos en las combinaciones codifica resistencia a *Botrytis*. El vector o vectores pueden estar en forma de un plásmido, y pueden utilizarse, en solitario o en

combinación con otros plásmidos, para proporcionar plantas transgénicas que son resistentes a *Botrytis*, utilizando métodos de transformación conocidos en la técnica, tales como el sistema de transformación de *Agrobacterium*.

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

Un método para introducir un vector de expresión en una planta se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium* (véase por ejemplo Horsch y otros, 1985). *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias edáficas patógenas de plantas que transforman genéticamente células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta (véase por ejemplo Kado, 1991). Los métodos para introducir vectores de expresión en tejido vegetal incluyen la infección directa o el cocultivo de células vegetales con *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch y otros, 1985). Las descripciones de sistemas vectores de *Agrobacterium* y métodos para transferencia génica mediada por *Agrobacterium* dados a conocer por Gruber y Crosby, 1993 y Moloney y otros, 1989. Véase también la patente de Estados Unidos No. 5.591.616. Descripciones generales de vectores de expresión en plantas y genes informadores y protocolos de transformación y descripciones de sistemas de vectores de *Agrobacterium* y métodos para transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* pueden encontrarse en Gruber y Crosby, 1993. Métodos generales de cultivo de tejidos vegetales se dan a conocer por ejemplo por Miki y otros, 1993 y por Phillips, y otros, 1988. Un manual de referencia apropiado para técnicas de clonación molecular y vectores de expresión adecuados es Sambrook y Russell (2001).

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

Después de la transformación de tejidos diana de tomate, la expresión de los genes marcadores seleccionables descritos anteriormente permite la selección preferencial de células, tejidos y/o plantas transformadas, utilizando métodos de regeneración y selección actualmente bien conocidos en la técnica. Los marcadores de las tablas 1 ó 2 también pueden utilizarse para ese fin.

Producción de plantas de tomate resistentes a *Botrytis* mediante métodos no transgénicos

En una realización alternativa para producir una planta de tomate resistente a *Botrytis*, puede utilizarse fusión de protoplastos para la transferencia de ácidos nucleicos desde una planta donadora a una planta receptora. La fusión de protoplastos es una unión inducida o espontánea, tal como una hibridación somática, entre dos o más protoplastos (células cuyas paredes celulares se eliminan mediante tratamiento enzimático) para producir una única célula binucleada o multinucleada. La célula fusionada, que puede obtenerse incluso con especies vegetales que no pueden interculturarse en la naturaleza, se cultiva en cultivo tisular en una planta híbrida que muestra la combinación de rasgos deseable. Más específicamente, un primer protoplasto puede obtenerse de una planta de tomate u otra línea vegetal que muestra resistencia a la infección por *Botrytis*. Por ejemplo, puede utilizarse un protoplasto de *L. hirsutum* LYC 4/78. Un segundo protoplasto puede obtenerse a partir de un segundo tomate u otra variedad vegetal, preferentemente una línea de tomate que comprende características deseables desde el punto de vista comercial, tales como, aunque sin limitarse a las mismas, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas del fruto, etc. Los protoplastos se fusionan a continuación utilizando procedimientos de fusión de protoplastos tradicionales, que se conocen en la técnica.

Como alternativa, puede emplearse rescate de embriones en la transferencia de un ácido nucleico que comprende uno o más QTL desde una planta donadora a una planta receptora. El rescate de embriones puede utilizarse como un procedimiento para aislar embriones a partir de cruces en los que las plantas no consiguen producir una semilla viable. En este proceso, el ovario fertilizado o la semilla inmadura de una planta se cultiva en cultivo tisular para crear nuevas plantas (Pierik, 1999).

En el presente documento se describe un método de producción de una planta de tomate resistente a *Botrytis* que comprende las etapas de realizar un método para detectar la presencia de un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con resistencia a *B. cinerea* en una planta de tomate donadora tal como se ha descrito anteriormente, y transferir una secuencia de ácido nucleico que comprende, como mínimo, un QTL detectado de este modo, o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis*, desde dicha planta donadora a una planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis*. La transferencia de dicha secuencia de ácido nucleico puede realizarse mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente en el presente documento.

Dicho método comprende la transferencia mediante introgresión de dicha secuencia de ácido nucleico desde una planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* a una planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis* cruzando dichas plantas. Esta transferencia puede conseguirse, por lo tanto, adecuadamente utilizando técnicas de obtención tradicionales. Los QTL se introgresan preferentemente en variedades comerciales de tomate utilizando obtención asistida por marcadores (MAS). La obtención asistida por marcadores o selección asistida por marcadores implica la utilización de uno o más de los marcadores moleculares para la identificación y selección de aquellas plantas de la descendencia que contienen uno o más de los genes que codifican el rasgo deseado. En el presente caso, dicha identificación y selección se basa en la selección de QTL o marcadores asociados con ellos. La MAS también puede utilizarse para desarrollar líneas casi isogénicas (NIL) que albergan el QTL de interés, permitiendo un estudio más detallado del efecto de cada QTL y también es un método eficaz para el desarrollo de poblaciones de línea endogámica de retrocruzamiento (BIL) (véase por ejemplo Nesbitt y otros, 2001; van Berloo y otros, 2001). Las plantas de tomate desarrolladas según este método pueden obtener ventajosamente una mayoría de sus rasgos desde la planta receptora, y obtener resistencia a *Botrytis* de la planta donadora.

Dado que ahora se ha descubierto que la resistencia a *B. cinerea* se hereda poligénicamente, es preferente que, como mínimo, dos, preferentemente tres QTL o partes que otorgan resistencia a *Botrytis* del mismo, se inserten mediante un método de transferencia adecuado en una única planta receptora, es decir que múltiples QTL se apilen en el genoma de la planta receptora. Se cree que el apilamiento de dos o más QTL puede conducir a una mayor resistencia a *Botrytis*. Como el experto en la materia entenderá fácilmente, el apilamiento puede conseguirse mediante cualquier método, por ejemplo transformando una planta con una construcción de ácido nucleico que comprende múltiples QTL. Como alternativa, como mínimo un QTL puede estar presente en cada planta progenitora de un cruce, de modo que, como mínimo, dos QTL estén comprendidos en el híbrido resultante. Mediante apilamiento de estos rasgos de resistencia, pueden obtenerse plantas altamente resistentes.

Tal como se ha descrito de forma breve anteriormente, pueden utilizarse técnicas de obtención tradicionales para introgresar una secuencia de ácido nucleico que codifica resistencia a *Botrytis* en una planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis*. En un método, que se denomina como obtención de linaje, una planta de tomate donadora que muestra resistencia a *Botrytis* y que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica resistencia a *Botrytis* se cruza con una planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis* que, preferentemente, muestra características deseables desde el punto de vista comercial, tales como, aunque sin limitarse a las mismas, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas del fruto, etc. La población de plantas resultantes (que representa los híbridos F₁) se autopoliniza a continuación y genera semillas (semillas F₂). Las plantas F₂ crecen a partir de las semillas F₂ y a continuación se criban para resistencia a *Botrytis*. La población puede cribarse en una serie de diferentes maneras.

En primer lugar, la población puede cribarse utilizando una criba de enfermedades tradicional. Dichas cribas de enfermedad se conocen en la técnica. Preferentemente se utiliza un bioensayo de infección en el tallo o en la hoja cuantitativo, preferentemente se utiliza el bioensayo en el tallo utilizado en métodos tal como se perfila con más detalle anteriormente en el presente documento y en los ejemplos. En segundo lugar, puede realizarse selección asistida por marcadores utilizando uno o más de los marcadores moleculares descritos anteriormente en el presente documento para identificar aquella progenie que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica resistencia a *Botrytis*. Pueden utilizarse otros métodos, denominados anteriormente en el presente documento como métodos para detectar la presencia de un QTL. Además, puede utilizarse selección asistida por marcadores para confirmar los resultados obtenidos de los bioensayos cuantitativos y, por lo tanto, también pueden utilizarse varios métodos en combinación.

Plantas y semillas de tomate resistentes a *Botrytis*

Una planta de tomate de *L. esculentum* resistente a *Botrytis* de la presente invención se caracteriza por tener un elevado nivel de resistencia. Esto se define como siendo un nivel de resistencia que es más elevado que el observado para plantas de control susceptibles. De hecho, las plantas de la presente invención tienen un nivel de resistencia que es más elevado que el de cualquier variedad de tomate comercial, es decir una variedad que tiene características deseables desde el punto de vista comercial, conocida hasta la fecha. Una planta tal como se ha descrito tiene una susceptibilidad a *Botrytis cinerea* que es, como mínimo, 3 veces menor que una planta de control susceptible cuando se mide mediante un bioensayo. Por ejemplo, cuando se mide mediante un bioensayo en el que la longitud promedio de una lesión del tallo que resulta de la infección por *Botrytis cinerea* en plantas adultas se mide durante un periodo de tres semanas en condiciones de práctica estándar tal como se describe con más detalle en

los ejemplos 3.10 y 3.11. Habitualmente, una planta tal como se describe tiene un nivel de resistencia que da como resultado una longitud de la lesión del tallo promedio de lesiones por *Botrytis cinerea* en plantas adultas de menos de 3,2 cm tres semanas después de la inoculación utilizando condiciones de práctica estándar en un bioensayo de resistencia diseñado para determinar resistencia en base a dichas características. Más habitualmente, una planta muestra una longitud de la lesión del tallo promedio de menos de 2,9 cm. Algunas plantas muestran incluso una longitud de la lesión del tallo promedio de 2,0 cm. Teniendo en cuenta que dichos números expresan la longitud de una lesión que incluye la herida de inoculación inicial de 2 cm, puede inferirse en las plantas que se observa un nivel elevado de resistencia, e incluso resistencia completa en el caso de algunos QTL. En comparación, plantas de control susceptibles muestran una longitud de la lesión del tallo promedio media en las mismas condiciones de aproximadamente 3,6 cm a aproximadamente 6,0 cm, con un promedio de 4,85 cm (véase la tabla 10). También como comparación, *L. hirsutum* LA 1777, el QTL-10 que contiene la fuente parcialmente resistente a *Botrytis* del documento WO02/085105, muestra una longitud de la lesión del tallo promedio en las mismas condiciones de aproximadamente 4,3 cm. En resumen, las plantas muestran lesiones del tallo netas en el bioensayo de resistencia mencionado anteriormente que son generalmente menos de aproximadamente el 30% (0,9/2,85 x100%) de la longitud neta de plantas de control susceptibles, y generalmente menos de aproximadamente el 40% (0,9/2,3 x 100%) de la longitud neta de *L. hirsutum* LA 1777 parcialmente resistente.

Por lo tanto, una planta tiene una susceptibilidad a *Botrytis cinerea* cuando se mide mediante un bioensayo que es 3 veces menor que, o que es menor que 1/3 del nivel de una planta de control susceptible. Recíprocamente, una planta es más de 3 veces más resistente que una planta de control susceptible, tal como se define en el presente documento y se determina con el bioensayo tal como se ha descrito. Con algunos QTL o combinaciones de QTL (por ejemplo QTL-1h y las combinaciones de QTL-3p+QTL-4p o QTL-9p+QTL-4p) se observa resistencia completa (véase la tabla 10). Una planta de control susceptible se define como una planta que muestra susceptibilidad normal, o ninguna resistencia, a infección por *Botrytis cinerea*. Los ejemplos de plantas de control susceptibles son el híbrido *Lycopersicon esculentum* cv. "Tradiro", y *Lycopersicon esculentum* cv. "Moneyberg" (De Ruiters Seeds CV, Bergschenhoek, Países Bajos).

Una planta de tomate de *L. esculentum* resistente a *Botrytis*, o una parte de la misma, que puede obtenerse mediante un método tal como se describe en el presente documento también es un aspecto de la presente invención.

En el presente documento se describe, además, una planta de tomate resistente a *Botrytis*, o parte de la misma, que comprende dentro de su genoma, como mínimo, un QTL, o una parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis*, seleccionado entre el grupo que comprende los QTL en los cromosomas 1, 2 y 4 de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 y los QTL en los cromosomas 3, 4 y 9 en *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 asociado con resistencia a *Botrytis*, en el que dicho QTL o dicha parte del mismo que otorga resistencia a *Botrytis* no está en su contexto genético natural. Las plantas de tomate resistentes a *Botrytis* de la presente invención pueden ser de cualquier tipo genético tal como endogámicas, híbridas, haploides, dihaploides, partenocárpicas o transgénicas. Además, las plantas pueden ser heterocigóticas u homocigóticas para el rasgo de resistencia, preferentemente homocigóticas.

Líneas de planta de tomate endogámicas resistentes a *Botrytis* pueden desarrollarse utilizando las técnicas de selección recurrente y retrocruzamiento, autofertilización y/o dihaploides o cualquier otra técnica utilizada para preparar líneas parentales. En un método de selección y retrocruzamiento, la resistencia a *Botrytis* puede introgresarse en una planta receptora diana (que se denomina el progenitor recurrente) cruzando el progenitor recurrente con una primera planta donadora (que es diferente del progenitor recurrente y se denomina en el presente documento como el "progenitor no recurrente"). El progenitor recurrente es una planta que no es resistente o tiene un bajo nivel de resistencia a *Botrytis* y posee características deseables desde el punto de vista comercial, tales como, aunque sin limitarse a las mismas, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas del fruto, etc. El progenitor no recurrente muestra resistencia a *Botrytis* y comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica resistencia a *Botrytis*. El progenitor no recurrente puede ser cualquier variedad o línea endogámica de planta que es fértil en cruzamiento con el progenitor recurrente. La progenie resultante de un cruce entre el progenitor recurrente y el progenitor no recurrente se retrocruza con el progenitor recurrente. La población de plantas resultante se criba a continuación. La población puede cribarse en una serie de maneras diferentes. Por ejemplo, la población puede cribarse utilizando un bioensayo cuantitativo del tallo tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Las plantas híbridas F₁ que muestran un fenotipo resistente a *Botrytis* comprende la secuencia de ácido nucleico requisito que codifica resistencia a *Botrytis*, y posee características deseables desde el punto de vista comercial, se seleccionan a continuación y se autofertilizan y seleccionan para una serie de generaciones para permitir que la planta de tomate se vuelva cada vez más endogámica. Este proceso de autofertilización y selección continua puede realizarse durante de dos a cinco o más generaciones. El resultado de dicha obtención y selección es la producción de líneas que son genéticamente homogéneas para los genes asociados con resistencia a *Botrytis* así como otros genes asociados con rasgos de interés comercial. En lugar de utilizar cribas de patología fenotípica de bioensayos, puede realizarse MAS utilizando uno o más de los marcadores moleculares, sondas de hibridación o polinucleótidos descritos anteriormente en el presente documento para identificar aquella progenie que comprende secuencia de ácido nucleico que codifica resistencia a *Botrytis*. Como alternativa, puede utilizarse MAS para confirmar los resultados obtenidos de los bioensayos cuantitativos. Una vez que se han realizado las selecciones apropiadas, el proceso se repite. El proceso de retrocruzamiento con el

progenitor recurrente y selección para resistencia a *Botrytis* se repite durante aproximadamente cinco o más generaciones. La progenie resultante de este proceso es heterocigótica para uno o más genes que codifican resistencia a *Botrytis*. La generación del último retrocruzamiento se autofertiliza a continuación para proporcionar una progenie de obtención pura homocigótica para resistencia a *Botrytis*.

Las líneas de tomate endogámicas resistentes a *Botrytis* descritas en el presente documento pueden utilizarse en cruzamientos adicionales para crear plantas híbridas resistentes a *Botrytis*. Por ejemplo, una primera planta de tomate endogámica resistente a *Botrytis* de la presente invención puede cruzarse con una segunda planta de tomate endogámica que posee rasgos deseables desde el punto de vista comercial tales como, aunque sin limitarse a los mismos, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características deseables del fruto, etc. Esta segunda línea de tomate endogámica puede ser o no resistente a *Botrytis*.

Se describe, además, un método de producción de semillas que pueden cultivarse para dar plantas de tomate resistentes a *Botrytis*. El método puede comprender las etapas de proporcionar una planta de tomate resistente a *Botrytis* de la presente invención, cruzar dicha planta resistente a *Botrytis* con una planta de *Lycopersicon esculentum*, y recoger semillas que resultan de dicho cruce que, cuando se plantan, producen plantas de tomate resistentes a *Botrytis*.

El método puede comprender, además, las etapas de proporcionar una planta de tomate resistente a *Botrytis*, cruzar dicha planta resistente a *Botrytis* con una planta de *Lycopersicon esculentum*, recoger semillas que resultan de dicho cruce, regenerar dichas semillas en plantas, seleccionar plantas resistentes a *Botrytis* mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, autocruzar las plantas seleccionadas durante un número suficiente de generaciones para obtener plantas que están fijadas a para un alelo que otorga resistencia a *Botrytis* en las plantas, retrocruzar las plantas producidas de este modo con plantas de *L. esculentum* que tienen rasgos fenotípicos deseables durante un número suficiente de generaciones para obtener plantas de *L. esculentum* que son resistentes a *Botrytis* y tienen rasgos fenotípicos deseables, y recoger las semillas producidas a partir de las plantas que resultan del último retrocruzamiento que, cuando se plantan, producen plantas de tomate que son resistentes a *Botrytis*.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Método de identificación de plantas resistentes a *Botrytis cinerea*.

1.1. Introducción.

Este ejemplo presenta el desarrollo de un bioensayo cuantitativo para evaluar la resistencia a *Botrytis cinerea* de una colección de genotipos silvestres de tomate.

La resistencia parcial contra *Botrytis cinerea* se ha descrito en especies silvestres de *Lycopersicon*, pero estos informes han sido en gran medida descriptivos y cualitativos. La identificación de genotipos parcialmente resistentes proporcionaría perspectivas para introgresar resistencia en líneas de obtención comerciales para obtener líneas con niveles de resistencia manejables. La disponibilidad de un ensayo reproducible, objetivo y cuantitativo, así como la identificación de genotipos con una resistencia (parcial) al moho gris genéticamente determinada abre la vía para la obtención de resistencia en variedades de tomate cultivado.

El presente ejemplo describe un ensayo de enfermedad cuantitativo. El ensayo se aplica en hojas (ensayo de inoculación de hojas) y segmentos del tallo (ensayo de inoculación del tallo). Se examinaron dos parámetros para susceptibilidad a la enfermedad. El primer parámetro era la incidencia de la enfermedad (DI), es decir la proporción de gotas de inoculación que dieron como resultado una lesión en expansión. Si la incapacidad (parcial) de una lesión primaria por *B. cinerea* para expandirse en un genotipo huésped particular es un rasgo genético de la planta, dicho rasgo es importante dado que limita directamente el número de focos de enfermedad en el cultivo. El segundo parámetro ensayado fue la tasa de crecimiento de la lesión durante un periodo de 24 horas (crecimiento de la lesión, LG). Las lesiones que se expandieron desde el punto de inoculación primaria parecían extenderse a una velocidad uniforme (en mm/día) a lo largo del tiempo hasta que la lesión alcanzaba el borde de la hoja o el extremo inferior del segmento del tallo. Los presentes ensayos permiten la cuantificación tanto de la aparición (incidencia de la enfermedad) como el desarrollo (crecimiento de la lesión) de infección por *B. cinerea*, dando como resultado dos conjuntos de datos de rasgos cuantitativos. El ensayo se utilizó para cribar una colección de especies de *Lycopersicon* (en lo sucesivo en el presente documento denominadas también "números de registro de adquisiciones") para la presencia de resistencia en su interior.

1.2. Plantas

Los genotipos vegetales ensayados se enumeran en la tabla 3.

Tabla 3: Lista de genotipos de *Lycopersicon* ensayados.

Código	Fuente ⁽¹⁾	Especie	Especificación/ variedad cultivada	Hoja ⁽²⁾	Tallo ⁽²⁾	Referencia ⁽³⁾
78/1604	DRS	<i>L. esculentum</i>	Kecksemeti Torpe	Y	Y	
82/2577	DRS	<i>L. esculentum</i>	Futura	Y	Y	
83/2896	DRY	<i>L. esculentum</i>	Biruinca	Y		
89/3695	DRS	<i>L. esculentum</i>	X <i>L. esculentum</i> var. cerasiforme		Y	
89/3793	DRS	<i>L. pimpinellifolium</i>			Y	
89/3862	DRS	<i>L. esculentum</i>	Olomoucke	Y		
90/4063	DRS	<i>L. esculentum</i>	L 4034	Y		
91/4311	DRS	<i>L. esculentum</i>	Seedathip 2	Y	Y	
96/4326	DRS	<i>Solanum lycopersicoides</i>	Gb nr 90124	Y	Y	
MM	WU PPW	<i>L. esculentum</i>	Money maker	S	S	
G1.1290	WU LoPB	<i>L. hirsutum</i>			Y	
G1.1556	WU LoPB	<i>L. chilense</i>		Y	Y	
G1.1558	WU LoPB	<i>L. chilense</i>		Y		
G1.1560	WU LoPB	<i>L. hirsutum</i>		Y	Y	
G1.1601	WU LoPB	<i>L. parviflorum</i>		Y	Y	
G1.1615	WU LoPB	<i>L. cheesmanii</i>			Y	
IZ.2 ⁽³⁾	MPIZK	<i>L. pimpinellifolium</i>			Y	(Urbasch, 1986)
LA.716	TGRC	<i>L. pennellii</i>		Y		
LA.2157	TGRC	<i>L. peruvianum</i>			Y	
LA.2172	TGRC	<i>L. peruvianum</i>			Y	
Lyc. 4/78 ⁽³⁾	IPK	<i>L. hirsutum</i>		Y	Y	(Urbasch, 1986)
T160/79 ⁽³⁾	IPK	<i>L. glandulosum</i>			Y	(Urbasch, 1986)
T566/81 ⁽³⁾	IPK	<i>L. hirsutum</i>			Y	(Urbasch, 1986)

¹ **DRS:** De Ruiters Seeds, Bergschenhoek, Países Bajos; **WU PPW:** Plantkundig Proefcentrum Wageningen, Wageningen University, Wageningen, Países Bajos; **LoPB:** Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, Wageningen, Países Bajos;
MPIZK: Max Planck Institut für Züchtungsforschung an Kulturpflanze, Colonia, Alemania;
TGRC: Tomato Genetics Resource Center, University of California at Davis, Davis CA, Estados Unidos;
IPK: Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Alemania.
² Y indica que el genotipo se ensayó en el ensayo particular, S indica que el genotipo sirvió como control de referencia susceptible.
⁽³⁾ Publicado antes como resistente contra *B. cinerea*.

Las plantas se cultivaron en tierra para macetas en macetas de 12 cm en un invernadero con temperatura mínima de 15°C. Se aplicó luz de lámpara de sodio artificial (16 horas/día) de octubre a marzo. A los 5-7 días después de la germinación, se añadieron 10 ml de solución de FeNaEDTA (3,5 g/l, seguida 3 días después por 10 ml de solución micronutriente (0,286 g/l de H₃BO₃; 0,1558 g/l de MnSO₄·H₂O; 0,008 g/l de CuO₄·H₂O; 0,022 g/l de ZnSO₄; 0,00196 de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O). A partir de dos semanas después de la germinación en adelante, se añadieron 5 ml de una solución de Hoagland (Ca(NO₃)₂ 5 mM; KNO₃ 5 mM; MgSO₄ 2 mM; KH₂PO₄ 1 mM) a intervalos semanales.

10 1.3. Ensayo en hojas

Se preparó un inóculo de la cepa B05.10 de *B. cinerea* según Benito (1998). Para cada planta individual, una o dos hojas compuestas que estaban completamente estiradas se desprendieron del tallo principal con una cuchilla afilada y se transfirieron a espuma floral humedecida previamente. La espuma floral se colocó en una placa de Petri que contenía agua corriente y posteriormente se colocó en un recipiente humedecido por pulverización que contenía papel de filtro húmedo. Las hojas compuestas se inocularon a continuación con una suspensión conidial de *B. cinerea* pipeteando cuidadosamente un total de 6 a 10 gotas de inóculo (2 µl) sobre la superficie superior de las hojas. Los recipientes se cerraron con una tapa humedecida por pulverización y se incubaron a 15°C en la oscuridad al 100% de HR, esencialmente tal como describen Benito y otros, 1998. Los datos en la tabla 4 se derivaban de un

ensayo en el que una hoja compuesta se dividió en cuatro hojuelas, y en el que a cada hojuela se le inocularon 10 gotas de 2 μ l cada una, que contenían 2000 conidios. Tanto la proporción de lesiones en expansión agresivas (incidencia de la enfermedad) como la tasa de crecimiento de la lesión se monitorizaron durante varios días.

5 Para corregir la variación causada por la estación o el cultivo de las plantas, la incidencia de la enfermedad de un genotipo particular en cada experimento se relacionaba con la incidencia de la enfermedad de Moneymaker ensayada en ese mismo experimento.

10 Los tamaños de la lesión se midieron a 96, 120 y 144 hpi utilizando un calibre. La incidencia de la enfermedad se determinó dividiendo el número total de lesiones en expansión por el número total de gotas de inoculación. Las tasas de crecimiento de la lesión se determinaron calculando el aumento del tamaño de la lesión (en mm) durante un periodo de 24 horas. Los datos para las lesiones no en expansión se borraron de los análisis cuantitativos. Los resultados del ensayo en hojas se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Incidencia de la enfermedad (DI, en %) y tasas de crecimiento de la lesión (LG, en mm/día ± desviación estándar) en hojas de números de registro de adquisiciones de *Lycopersicon* inoculadas con B. cinerea. Los experimentos se realizaron en 1999 y 2000 en diferentes semanas (a) como se indica.

Semana	1999										2000					
	10	11	12	16	17	26	27	30	31	33	35	5	6			
Número de registro de adquisiciones	DI								14%							
78/1604	LG			19%					3,3±1,3							
82/2577	DI			26%								32%				
	LG			3,1±2,0								6,0±2,0				
83/2896	DI			38%	23%	55%										
	LG			3,8±1,3	4,3±1,7	2,3±0,9										
89/3862	DI			61%	9%											
	LG			4,0±1,0	3,1±1,8											
90/4063	DI								53%							
	LG								3,8±1,0							
91/4311	DI					7%										
	LG					1,8±0,7										
96/4326	DI		6%				2%									
	LG		7,0±4,1				6,2±1,0									
T160/79	DI								6%	11%						
	LG								3,1±2,0	3,4±2,4						
G1.1556	DI	0%							4%							
	LG								1,3±0,9							
G1.1558	DI						3%									
	LG						2,4±1,0			0,8±0,7						
G1.1560	DI											20%				
	LG											2,9±1,8				
G1.1601	DI												18%			
	LG												3,8±2,0			
LA716	DI		21%													
	LG		5,2±1,7													
LYC	DI						1%									
4/78	DI						3,1±0,9					3%				
	LG															
MM	DI	78%	24%	53%	73%	57%	31%	25%	65%	15%		1,1±0,6				
	LG	6,4±2,3	4,8±1,8	8,2±2,5	3,8±1,4	2,8±1,0	4,6±1,1	3,9±1,1	3,4±1,4	2,2±1,5	4,3±1,4	26%	41%			

1.4. Ensayo en tallos (procedimiento estandarizado)

5 El ensayo en tallos se realizó de la siguiente manera: Los 5-10 cm superiores y los 5-10 cm inferiores del tallo de plantas de aproximadamente 50 cm de alto se eliminaron y los 30 cm restantes se cortaron en segmentos iguales de 5-6 cm. Cada segmento del tallo se colocó erguido en un enrejado con la base del tallo en papel de filtro húmedo. Antes de la inoculación, los segmentos del tallo se pulverizaron con agua corriente para garantizar una extensión igual del inóculo sobre la superficie herida. El inóculo se preparó tal como se ha descrito para el ensayo en hojas. Una gota de un inóculo de 5 μl , que contenía aproximadamente 10^6 conidios $\cdot \text{ml}^{-1}$, se aplicó sobre la parte superior de cada segmento del tallo. Se realizaron incubaciones a $15 \pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad con el 100% de humedad relativa. El avance de la infección se determinó midiendo el avance máximo de los síntomas de podredumbre a diversos intervalos de tiempo después de la inoculación con un calibre de Vernier.

15 Para cada genotipo, se calculó el porcentaje de trozos de tallo infectados. La incidencia de la enfermedad se determinó dividiendo el número total de segmentos del tallo con lesiones en expansión por el número total de segmentos inoculados. Las tasas de crecimiento de la lesión se determinaron calculando el aumento del tamaño de la lesión durante un periodo de 24 horas, con lo cual los datos para las lesiones no en expansión se omitieron del análisis. Los resultados del ensayo en tallos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Incidencia de la enfermedad (DI, en %) y tasas de crecimiento de la lesión (LG, en mm/día ± desviación estándar) en segmentos del tallo de números de registro de adquisiciones *Lycopersicon* inoculados con *B. cinerea*. Los experimentos se realizaron en 1999 y 2000 en las semanas indicadas.

Semana Número de registro de adquisiciones	1999					2000					
	30	32	33	35	46	48	5	6	27	30	
78/1604	DI										
	LG										
82/2577	DI	81%									
	LG	7,1±2,4									
89/3595	DI	82%									
	LG	5,9±2,1									
89/3793	DI										
	LG										
91/4311	DI										
	LG										
96/4326	DI			90%							
	LG			7,8±2,5							
160/79	DI			67%							
	LG			2,2±1,4							
G1.1290	DI					19%					
	LG					3,0±1,4					
G1-1556	DI					29%					
	LG					3,7±2,4					
G1.1560	DI		28%								
	LG		2,8±1,6								
G1.1601	DI	40%									
	LG	1,8±1,2									
G1.1615	DI					54%					
	LG					6,3±2,4					
IZ2	DI					77%					
	LG					4,5±1,9					
LA2157	DI					16%					
	LG					8,3±4,3					
LA2172	DI					41%					
	LG					6,6±2,4					
LYC 4/78	DI	29%									
	LG	4,6±2,9									
T566-81	DI					44%					
	LG					3,3±1,8					
MM	DI	52%				82%					
	LG	5,4±2,0				6,4±1,6					
						7,8±4,1					
						88%					
						9,2±4,4					
						88%					
						9,2±4,4					
						68%					
						6,8±3,7					
						95%					
						6,6±2,1					
						84%					
						6,4±1,6					
						94%					
						5,5±1,6					

1.5. Resultados

La incidencia de la enfermedad y el crecimiento de la lesión en experimentos de infección en hojas desprendidas se determinaron durante varios días para cada genotipo, habitualmente de 2-4 días postinfección. La incidencia de la enfermedad en *L. esculentum* cv. Moneymaker, que sirvió como referencia, fluctuaba entre el 15 y el 78% en estos experimentos. La tabla 4 muestra los resultados de 14 genotipos para los cuales se inocularon hojas compuestas desprendidas originarias, como mínimo, de 5 plantas individuales, con 40 puntos de inoculación por hoja (10 por hojuela). La incidencia de la enfermedad en estos 14 genotipos debe compararse con la de la línea de control *L. esculentum* cv. Moneymaker determinada en el mismo experimento/semana.

Excepto por los genotipos 82/2577 y 83/2896 (ambos de la especie *L. esculentum*), los genotipos ensayados mostraban en todos los experimentos una menor incidencia de la enfermedad que el Moneymaker. Los genotipos G1.1556, G1.1560 y G1.1601 mostraban una baja incidencia de la enfermedad en tres experimentos independientes, que variaban entre el 0 y el 21%. El análisis estadístico indicaba que la incidencia de la enfermedad en los genotipos 78/1604, 91/4311, 96/4326, G1.1556, G1.1558, G1.1560, G1.1601, LA716 y LYC 4/78 era significativamente más baja que en la línea de control *L. esculentum* cv. Moneymaker ($p < 0,05$). Existía, sin embargo, una gran variación entre semanas y algunas de las diferencias observadas en ensayos en hojas desprendidas pueden, en realidad, no ser muy robustas debido a las fluctuaciones de la incidencia de la enfermedad entre experimentos/semanas (15-78%).

Dentro de estos genotipos resistentes (con una incidencia de la enfermedad significativamente más baja que la de la referencia de Moneymaker), las lesiones que se expandieron con éxito a menudo lo hicieron a una velocidad similar que en Moneymaker (por ejemplo 96/4326, G1.1560, LA716). La situación opuesta no se descubrió: ninguno de los genotipos mostraba una incidencia de la enfermedad similar a la de Moneymaker pero una tasa de crecimiento de la lesión más lenta que Moneymaker.

La tabla 4 también presenta datos sobre las tasas de crecimiento promedio de lesiones en expansión en cada genotipo durante un periodo de 24 horas (entre 48 y 72 hpi). La tasa de crecimiento de la lesión en la mayor parte de los genotipos estaba en el mismo intervalo que en Moneymaker. Cinco números de registro de adquisiciones (91/4311, 160/79, G1.1556, G1.1601 y LYC 4/78) mostraron una tasa de crecimiento de la lesión más lenta, que era de forma estadística significativamente diferente de la del *L. esculentum* cv. Moneymaker.

El ensayo de infección de segmentos del tallo (tabla 5) pareció ser más robusto que el ensayo en hojas en términos de reproducibilidad entre experimentos realizados en diferentes estaciones. Incluso aunque el número de puntos de datos con segmentos del tallo (5-8 segmentos por planta) es muchísimo más pequeño que con el ensayo en hojas (40 gotas de inoculación por hoja compuesta, podían ensayarse una o dos hojas por planta), la variabilidad entre experimentos era generalmente más baja en el ensayo en segmentos del tallo. La incidencia de la enfermedad en el ensayo en tallos para el genotipo de control *L. esculentum* cv. Moneymaker variaba entre el 52-95%. La incidencia de la enfermedad en 17 genotipos (tabla 5) debe compararse con la incidencia de la enfermedad de la línea de control *L. esculentum* cv. Moneymaker determinada en el mismo experimento/semana. La mayoría de los genotipos mostraban una incidencia de la enfermedad en un intervalo similar al de la línea de control Moneymaker. Los genotipos G1.1556 (29% y 41%) y G1.1560 (28% y 7%) mostraban una incidencia de la enfermedad reducida. Solamente G1.1560 difería de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del control.

Las tasas de crecimiento de la lesión en el ensayo en tallos (tabla 5) para el genotipo de control *L. esculentum* cv. Moneymaker variaban entre 5,4 y 9,2 mm/día. Las tasas de crecimiento de la lesión de muchos genotipos estaban en un intervalo similar al del control. Sin embargo, en los números de registro de adquisiciones 89/3793, G1.1601, LYC 4/78, T566-81, la tasa de crecimiento de la lesión era diferente de forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$) del control cv. Moneymaker.

Con una serie de genotipos que se clasificaron como parcialmente resistentes en el ensayo en segmentos del tallo, se realizaron ensayos cualitativos en plantas completas, cultivadas en un invernadero de Rockwool®. El objetivo era evaluar si los genotipos que parecían resistentes en segmentos del tallo en condiciones de laboratorio eran de hecho más resistentes que las líneas de control en un sistema de cultivo semi-comercial. Las plantas se cultivaron en orden aleatorio en filas de Rockwool®, el compartimento del invernadero se llenó con fruta de cítricos fuertemente infectada por *B. cinerea* en el punto de esporulación. El compartimento del invernadero se mantuvo a humedad elevada pulverizando el suelo dos veces al día con agua corriente y dejando las puertas y ventanas cerradas. A intervalos regulares se realizaron heridas de poda en todas las plantas y se monitorizó la aparición de moho gris a lo largo del tiempo.

Se identificaron una serie de números de registro de adquisiciones silvestres de *Lycopersicon* que mostraban una grave reducción de ambos parámetros, proporcionando de este modo fuentes potenciales para introgresar dos, mecanismos potencialmente independientes de resistencia parcial en *L. esculentum*.

Ejemplo 2. Mapeo de QTL para resistencia a *Botrytis cinerea* en un cruce interespecífico de *Lycopersicon* (*L. esculentum* cv. Moneymaker x *Lycopersicon parviflorum* G1.1601)

2.1. Introducción

Un conjunto de números de registro de adquisiciones de *Lycopersicon* de diversos orígenes se cribó en busca de resistencia al patógeno fúngico *Botrytis cinerea* tal como se describe en el ejemplo 1. El número de registro de adquisiciones *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 mostraba en un ensayo en hojas una incidencia de la enfermedad más baja y también un crecimiento de la lesión más lento (véase las tablas 4 y 5 anteriores). Una población segregante, que comprendía 130 poblaciones F_3 derivadas de F_2 , originarias de un cruce entre *L. parviflorum* G.1601 y *L. esculentum* cv Moneymaker, se evaluó para resistencia a *B. cinerea* en un ensayo en tallos.

Se utilizaron marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados para construir un mapa de ligamiento y para realizar análisis de Locus de Rasgos Cualitativos. Se detectaron QTL tanto para incidencia de la enfermedad como para crecimiento de la lesión.

2.2. Material vegetal

Después de la identificación del número de registro de adquisiciones resistente, *Lycopersicon parviflorum* G1.1601, se utilizó una población segregante con este número de registro de adquisiciones como progenitor fundador (Huang, 2001), para análisis adicionales. La población segregante comprendía 130 poblaciones F_3 derivadas de F_2 .

2.3. Evaluaciones de la enfermedad

Para cada una de las 130 poblaciones F_3 , se cultivaron 5 plantones y se sometieron al ensayo en tallos descrito en el ejemplo 1 (véase 1.4). Por razones prácticas, el conjunto completo de mediciones se dividió (aleatoriamente) en 13 partes de igual tamaño. Cada semana se midió una parte que comprendía 50 plantas. Se utilizó un gran conjunto de plantas de control Moneymaker susceptibles para corregir diferencias ambientales entre semanas. Por razones prácticas *L. parviflorum* G1.1601 no se incluyó en el experimento. Las mediciones se realizaron tal como se describe en el ejemplo 1.

El avance de la infección se registró en dos puntos temporales después de la inoculación. (96 y 120 horas después de la infección). De esta manera tanto la incidencia de la enfermedad, que se define como el porcentaje de partes del tallo inoculadas que mostraban síntomas de enfermedad en el momento final de observación, como el crecimiento de la lesión, que se define como la velocidad promedio de desarrollo de la lesión por el tallo de tomate en un periodo de 24 horas, se determinaron tal como se describe en el ejemplo 1.

La distribución de las mediciones se muestra en la figura 4. Las distribuciones sugieren características de rasgos cuantitativos normales, por lo tanto adecuadas para una estrategia de mapeo de QTL.

2.4. Marcadores moleculares

No había ningún material de hojas de F_2 disponible; por lo tanto hojas de doce plantas F_3 derivadas de cada una de las 130 derivadas de F_2 se reunieron y se utilizaron para aislamiento de ADN. Se realizaron determinaciones de AFLP según Vos y otros (1995) utilizando un conjunto de 10 combinaciones de cebadores *Pst*/*Mse*.

2.5. Análisis de ligamiento y mapeo de QTL

Debido a la naturaleza dominante de los marcadores AFLP, los grupos de ligamiento paterno (*L. parviflorum*) y materno (*L. esculentum*) se calcularon por separado.

Los datos de los marcadores se analizaron y se calculó un mapa de ligamiento genético utilizando el paquete de software JoinMap[®] (versión 3.0; Plant Research International, Wageningen, Países Bajos). Los grupos de ligamiento se formaron en diversos umbrales de probabilidad logarítmicos (LOD). La fracciones de recombinación se convirtieron en distancias en el mapa utilizando la función de Kosambi (Kosambi, 1944). El resultado de JoinMap[®] se convirtió a un formato gráfico para mapas de ligamiento y representaciones gráficas de QTL utilizando el programa MapChart (Plant Research International). Se analizaron datos fenotípicos y se calcularon QTL utilizando MapQTL[®] (versión 4.0; Kyazma B.V., Wageningen, Países Bajos) mediante mapeo de intervalos (IM) y mapeo de múltiples QTL (MQM) (Jansen, 1993, 1994). Los datos fenotípicos calculados para la población F_2 procedían de los valores promedio del ensayo de enfermedad de todas las plantas en una línea F_3 . Se utilizó una transformación del arco seno para normalizar los datos de incidencia de la enfermedad. Los QTL se calcularon utilizando el algoritmo de mapeo de intervalos.

Para cada una de las 130 poblaciones F_3 , los datos combinados de marcadores y los datos de enfermedad se sometieron a análisis de QTL utilizando MapQTL[®]. Se realizó una primera ronda de mapeo de intervalos y se identificaron picos en el perfil de LOD. Todos los marcadores originarios del uno u otro progenitor se utilizaron

directamente para calcular mapas de ligamiento independientes. En total se colocaron 192 marcadores AFLP en los mapas de ligamiento paterno y materno. Los mapas de ligamiento masculino y femenino se utilizaron individualmente para mapeo de QTL. Se determinaron tres QTL (véase la tabla 6).

5 Tabla 6: Resumen de los resultados de mapeo de QTL en base a un mapa no integrado.

QTL en <i>L. parviflorum</i>	Región para selección	LOD Max	% de infección (no. de individuos)	Tamaño de las lesiones
QTL para incidencia de la enfermedad (Crom. 3)	23 cM	2,0	aa* 70% (12) b- 49% (87)	aa 5,7 mm b- 5,1 mm
QTL para incidencia de la enfermedad (Crom.4)	28 cM	2,8	aa 58% (17) b- 45% (76)	aa 5,9 mm b- 5,1 mm
QTL para crecimiento de la lesión (Crom. 9)	25 cM	2,0	aa 49% (27) b- 51% (56)	aa 5,8 mm b- 4,9 mm

aa es *L. esculentum* homocigótico para la región cromosómica completa. b- es *L. parviflorum* heterocigótico u homocigótico para la región del QTL.

10 La resistencia a *Botrytis* promedio de las 11 plantas con las tres regiones de QTL *L. parviflorum* heterocigótico u homocigótico (b-) reflejaba una incidencia de la enfermedad del 40% y un crecimiento de la lesión de 5,0 mm por día. Solamente una planta era *L. esculentum* homocigótico para las tres regiones de QTL y tenía una incidencia de la enfermedad del 72% y un crecimiento de la lesión de 7,2 mm por día. Cinco plantas fueron *L. esculentum* homocigótico para dos de los tres QTL y su incidencia de la enfermedad promedio era del 67% combinada con un crecimiento de la lesión de 5.8 mm (no se muestran los datos).

15 Este ejemplo muestra que fuentes genéticas como *L. parviflorum* G1.1601 pueden utilizarse para aumentar la resistencia a *B. cinerea* en tomate. Varios QTL tanto para incidencia de la enfermedad como para crecimiento de la lesión podían identificarse (tabla 6). Estos QTL pueden confirmarse en material de obtención más avanzado tal como líneas de retrocruzamiento.

20 La tabla 7 muestra los resultados experimentales de ensayos de resistencia a enfermedades de diversas líneas Fs que resultan de un cruce entre *L. esculentum* cv Moneymaker y *L. parviflorum* G.1601. Se muestra claramente que la línea de referencia BChirs5 utilizada en este experimento muestra un nivel más elevado de resistencia que el de las líneas de *L. parviflorum* (L parv) enumeradas. Sin embargo, la presencia de efectos de QTL también puede establecerse para los QTL de *parviflorum*.

25 Tabla 7: Longitud de la lesión del tallo promedio de lesiones por *Botrytis cinerea* en plantas adultas del número de registro de adquisiciones G.1601 de *L. parviflorum* tres semanas después de la inoculación.

Contexto*	Longitud de la lesión del tallo promedio (cm)	Desv. est.	D.I. (%)	QTL-3p (incidencia de la enf.)	QTL-4p (incidencia de la enf.)	QTL-9p (tasa de crecimiento de la lesión)
Tradiro	6,9	3,6	86			
Durintha	8,1	1,1	100			
Moneyberg	8,1	2,1	100			
GT	8,2	2,0	100			
BChirs5	0,3	1,2	5			
L. parv línea 1 PV960818	5,7	2,7	88	+	+	+
L. parv línea 2 92686 (F1)	3,1	2,1	57	n.d.	n.d.	n.d.
L. parv línea 3 PV960890	7,0	2,6	92	+	+	-
L. parv línea 6 PV960811	4,3	1,3	93	n.d.	+	+
L. parv línea 7 PV960730	4,8	2,1	93	+	+	-
L. parv línea 5 PV960860	5,9	2,2	100	-	-	-

Contexto*	Longitud de la lesión del tallo promedio (cm)	Desv. est.	D.I. (%)	QTL-3p (incidencia de la enf.)	QTL-4p (incidencia de la enf.)	QTL-9p (tasa de crecimiento de la lesión)
L. parv línea 4 PV960875	6,2	1,6	100	+	+	-
*) las líneas de referencia se indican en negrita: Tradiro es un híbrido, susceptible a <i>Botrytis</i> según los cultivadores; Durintha es un híbrido con resistencia parcial según los cultivadores; Moneyberg y Moneymaker son tipos similares de líneas susceptibles; GT es Moneyberg con resistencia a TMV; BChirs5 es una línea de retrocruzamiento resultante de introgresión de <i>L. hirsutum</i> LYC 4/78 y comprende el QTL-1h de <i>hirsutum</i> para crecimiento de la lesión. (+): presencia de heterocigótico u homocigótico; (-): no presente; n.d.: no determinado.						

Ejemplo 3. Mapeo de resistencia parcial a *Botrytis cinerea* en una población interespecífica de tomate (*L. esculentum* cv Moneymaker x *L. hirsutum* número de registro de adquisiciones LYC 4/78)

5 En este ejemplo, se presentan dos loci QTL que otorgan resistencia parcial a *B. cinerea* originarios de *L. hirsutum* LYC 4/78. Se obtuvo una confirmación de los resultados evaluando el nivel de resistencia a *B. cinerea* en dos poblaciones BC₂S₁ segregantes para uno de los dos loci QTL respectivamente.

3.1. Material vegetal

10 Las semillas de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 (en lo sucesivo en el presente documento denominado como LYC 4/78) se obtuvieron del banco de genes ubicado en el Institute for Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Alemania.

15 Las semillas de *Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker (en lo sucesivo en el presente documento denominado como Moneymaker) se obtuvieron del banco de semillas del De Ruiter Seeds cv, Bergschenhoek, Países Bajos.

20 Se realizó un cruce interespecífico entre Moneymaker y LYC 4/78 para producir semillas F₁. Las semillas F₁ se cultivaron a plantas F₁. Semillas F₂, derivadas de la autofertilización de una planta F₁ se sembraron para obtener una población F₂ de 174 individuos. Una población BC₂ (retrocruzamiento 2) de 59 individuos se generó mediante dos rondas de retrocruzamiento con Moneymaker como el progenitor recurrente y femenino. Utilizando MAS, se seleccionaron genotipos BC₂, BC₃, y BC₄ que contenían uno de los dos QTL identificados y algunos BC₂ se autopolinizaron para producir semillas BC₂S₁ (véase la figura 2). Se cultivaron dos poblaciones BC₂S₁: una de 60 individuos BC₂S₁ que segregaban para el QTL para incidencia de la enfermedad y otra de 47 individuos BC₂S₁ que segregaban para el QTL para crecimiento de la lesión.

3.2. Ensayo en tallos

30 Se preparó un inóculo de la cepa B05.10 de *B. cinerea* según Benito (1998). El ensayo en tallos se realizó tal como se describe en el ejemplo 1.

3.3. Aislamiento de ADN y análisis de marcadores

35 Se aisló ADN genómico de dos hojas jóvenes (enrolladas) utilizando un protocolo basado en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) según Steward y Via (1993), ajustado para aislamiento de ADN de alto rendimiento utilizando tubos Micronic de un ml (Micronic BV, Lelystad, Países Bajos) y se trituró utilizando un agitador Retsch de 300 mm a máxima velocidad (Retsch BV, Ochten, Países Bajos). El análisis de AFLP (Vos y otros, 1995) de las poblaciones F₂, BC₂, BC₃, BC₄ y BC₂S₁ se realizó y los fragmentos de AFLP se resolvieron en un secuenciador de ADN LI-COR 4200, siguiendo esencialmente el método publicado por Myburg (Myburg y otros 2001). El cebador Pst selectivo se marcó con una marca fluorescente IRD 700 o IRD 800. Las imágenes en gel de AFLP se valoraron utilizando el paquete de software AFLP-Quantar Pro (Keygene BV, Wageningen, Países Bajos). Se utilizaron las siguientes diez combinaciones de cebador y secuencias adaptadoras para el genotipado: P14M48, P14M49, P14M50, P14M60, P14M61, P15M48, P18M50, P18M51, P22M50 y P22M51, tal como describen Bai y otros (2003).

3.4. Análisis fenotípico de la población F₂

45 Se observó variación en la incidencia de la enfermedad entre los diferentes ensayos de *Botrytis* (véase el ejemplo 1, *supra*). Por lo tanto, se realizaron siete ensayos de la enfermedad en tallos consecutivos independientes en 172 de los 174 individuos de la población F₂ derivada del cruce entre Moneymaker x LYC 4/78. Esto dio como resultado, como mínimo, cinco evaluaciones independientes del bioensayo de la enfermedad para casi cada genotipo F₂. En cada bioensayo de la enfermedad individual, seis segmentos de tallo contribuyeron al cálculo del crecimiento de la lesión. Los valores promedio para incidencia de la enfermedad y crecimiento de la lesión para la población F₂ mostraron una distribución normal (no se muestran los datos). La incidencia de la enfermedad promedio para Moneymaker es del 59% con un crecimiento de la lesión de 9,2 mm/día. La incidencia de la enfermedad promedio

en la población F_2 variaba entre el 10% y el 97% con un promedio de la población del 48%. El crecimiento de la lesión variaba entre 3,3 mm y 11,5 mm/día con un promedio de 7,8 mm/día.

La incidencia de la enfermedad promedio de cada experimento individual variaba entre el 31% y el 73%, mientras que el crecimiento de la lesión promedio variaba entre 6,2 y 7,9 mm/día (tabla 8). El crecimiento de la lesión solamente puede calcularse si hay, como mínimo, infección en uno de los seis trozos de tallo. Por consiguiente, podía observarse un aumento del número de genotipos informativos para crecimiento de la lesión con incidencias de la enfermedad más elevadas. Por ejemplo, con la baja incidencia de la enfermedad promedio (31%) solamente el 52% de los genotipos fueron informativos para crecimiento de la lesión.

Tabla 8: Incidencia de la enfermedad promedio y crecimiento de la lesión promedio de siete experimentos según el ejemplo 3.4. Los valores promedio de las semanas están ordenados según el porcentaje de incidencia de la enfermedad.

Nº	Incidencia de la enfermedad promedio (%)	n	Tasa de crecimiento de la lesión promedio (mm/día)	n	% de plantas informativas para crecimiento de la lesión
1	40,6	172	6,4	116	67,4
2	43,3	155	7,9	117	75,5
3	30,9	109	6,3	57	52,3
4	54,2	51	7,2	43	84,3
5	55,4	139	7,5	111	79,9
6	73,9	153	7,9	144	94,1
7	37,5	140	6,6	86	61,4
Promedio	48,2	172	7,2	172	100,0

3.5. Marcadores moleculares y mapa de ligamiento genético

Se calculó un mapa de ligamiento genético para una población F_2 ($n=174$) derivada del cruce de Moneymaker x LYC 4/78. Se utilizaron diez combinaciones de cebadores para obtener 218 marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) en la población F_2 ($n = 174$). Un total de 69 marcadores (31,7%) podían valorarse fácilmente de forma codominante, permitiendo de este modo el cálculo de un mapa de ligamiento genético de F_2 integrado. El análisis de marcadores realizado en genotipos BC_2 , BC_3 y BC_2S_1 permitió la adición de 145 marcadores AFLP adicionales. Un total de 102 de estos 145 marcadores AFLP adicionales no estaban valorados previamente debido a la complejidad de los geles de F_2 . El mapa de ligamiento genético global comprendía 315 marcadores de AFLP de 14 grupos de ligamiento y tiene una longitud total de 958 cM. Dado que los marcadores AFLP comigrantes dentro de una especie son generalmente específicos de alelo, se utilizó la colinealidad con otros mapas de ligamiento de AFLP para asignar grupos de ligamiento con cromosomas. Algunos marcadores AFLP específicos de Moneymaker estaban en común con los mapas de ligamiento genético según lo publicado (Haanstra y otros 1999; Bai y otros 2003) y, por lo tanto, algunos grupos de ligamiento podían asignarse a cromosomas, incluyendo los grupos de ligamiento que albergaban los QTL identificados. Para mejorar el mapa de ligamiento en los intervalos de QTL, se añadieron marcadores CAPS de diagnóstico en estas regiones en base al mapa de *L. esculentum* x *L. pennellii* publicado (Tanksley y otros 1992; Haanstra y otros 1999).

3.6. Análisis de ligamiento y mapeo de QTL

Se analizaron los datos de marcadores y se calculó un mapa de ligamiento genético tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

La longitud total del mapa de ligamiento de F_2 era de 958 cM, que es menos que otros mapas de *Lycopersicon* interespecíficos publicados con longitudes genéticas que varían entre 1200-1400 cM (Foolad y otros 2002; Haanstra y otros 1999; Tanksley y otros 1992). Marcadores AFLP adicionales se valoraron utilizando datos de marcadores AFLP obtenidos de poblaciones de retrocruzamiento y BC_2S_1 . Aunque se colocaron un 46% más de marcadores en el mapa de ligamiento, la longitud del mapa de ligamiento genético no aumentó. La razón para esto es que los datos utilizados se obtuvieron de varias pequeñas subfamilias y, por lo tanto, no eran informativos para el cálculo de distancias genéticas, pero la estimación de la posición es posible mediante inspección visual de los genotipos gráficos (Van Berloo, 1999).

3.7. Mapeo de QTL en la población F_2

Los datos fenotípicos y del marcador se utilizaron para la identificación de QTL por medio de mapeo de intervalos (IM, véase el ejemplo 2). El IM se aplicó tanto a datos obtenidos de duplicados individuales como a los valores promedio de los duplicados.

Incidencia de la enfermedad

El mapeo de intervalos para incidencia de la enfermedad en la población F₂ se realizó para aquellos ensayos de enfermedad individuales con una incidencia de la enfermedad promedio menor del 50% y para datos promedio obtenidos de todos los ensayos de enfermedad (tabla 8). Los datos promedio de todos los ensayos dieron en el procedimiento de mapeo de intervalos un único valor de QTL significativo para incidencia de la enfermedad (el valor de la probabilidad de ocurrencia (likelihood of odds) (LOD) debe ser mayor de 3,4 para un nivel de confianza en todo el genoma de $P < 0,05$). Este QTL tenía un valor LOD de 4,5 y explicaba el 13% de la variación fenotípica total (tabla 9). El alelo que contribuye a una resistencia es originario del progenitor resistente LYC 4/78. El mapeo de QTL en cada experimento individual dio los cuatro casos en la misma región de QTL. En cada experimento independiente ocasionalmente se observaron otros "QTL secundarios".

Crecimiento de la lesión

El crecimiento de la lesión puede medirse, de la mejor manera, en aquellos ensayos de enfermedad con una incidencia de la enfermedad elevada. Para mapeo de QTL, se utilizó el promedio de todos los 7 ensayos de enfermedad y se identificó un QTL para crecimiento de la lesión de *B. cinerea* por encima del umbral (LOD 3,4 para un nivel de confianza en todo el genoma de $P < 0,05$). Este QTL tenía un valor LOD de 4,2 y explicaba el 12% de la variación fenotípica total (tabla 9). El efecto positivo era originario del progenitor resistente LYC 4/78. La necesidad de realizar múltiples ensayos de enfermedad se ilustra debido a que solamente en una única repetición se descubrió un perfil de LOD por encima del umbral.

Tabla 9: Estimación de los efectos calculados para plantas homocigóticas para Moneymaker (A), heterocigótica (H) u homocigótica para LYC 4/78 (B). Los valores para la población F₂ se calcularon con el procedimiento de mapeo de intervalos, mientras que los valores para la población BC₂S₁ se calcularon con un análisis de Kruskal-Wallis.

Cromosoma	Pop	LOD	A	H	B	% Expl
1 (crecimiento de la lesión)	F ₂	4,2	8,8	7,8	7,1	11,9
	BC ₂ S ₁		6,2	5,2	4,9	ND ^a
2 (Incidencia de la enfermedad)	F ₂	4,5	63,4	47,1	43,5	13,0
	BC ₂ S ₁		77,0	72,3	59,9	ND

^aND = No determinado

3.8. Confirmación de QTL en un bioensayo

La planta F₁ del cruce Moneymaker x LYC 4/78 se retrocruzó dos veces con Moneymaker y las 59 plantas de la progenie se cribaron para la presencia de las regiones de los dos QTL identificados (uno para incidencia de la enfermedad y uno para crecimiento de la lesión) utilizando marcadores AFLP. Las plantas, heterocigóticas para uno de los dos QTL identificados, se seleccionaron y se autofertilizaron para obtener dos poblaciones BC₂S₁. Un total de cuatro bioensayos de enfermedad se realizaron con cada genotipo de BC₂S₁. Los datos de ambas subpoblaciones BC₂S₁, analizados con SPSS, mostraron distribuciones normales para crecimiento de la lesión, pero no para incidencia de la enfermedad, dado que se observaron algunas subclases (figura 2).

Todas las plantas de BC₂S₁ se genotiparon mediante AFLP con las mismas 10 combinaciones de cebadores que las descritas para la población F₂ en la sección 3.3 anterior. El crecimiento de la lesión promedio en la población que segregaba para el locus de crecimiento de la lesión era de 5,3 mm/día mientras que en la otra población se observó un crecimiento de la lesión promedio de 6,3 mm/día. Ninguna planta individual tenía un crecimiento de la lesión tan bajo como el progenitor resistente LYC 4/78. Para incidencia de la enfermedad, sin embargo, se observaron plantas con una incidencia de la enfermedad más baja que el progenitor resistente LYC 4/78. Las incidencias de la enfermedad promedio para ambas poblaciones BC₂S₁ eran iguales (57-59%).

El efecto positivo de cada QTL se confirmó en las poblaciones BC₂S₁. El QTL para incidencia de la enfermedad reducía la probabilidad de infección en el 17% (46% de la variación parental) y el QTL para crecimiento de la lesión reducía el crecimiento fúngico en 1,3 mm/día (33% de la variación parental).

Una comparación con datos obtenidos de la población F₂ se presenta en la tabla 8. Solamente una parte de la variación podía explicarse mediante el efecto de ambos QTL. Se identificaron algunos loci QTL ("secundario") adicionales.

Durante el análisis de datos de ensayos de enfermedad obtenidos de ambos genotipos F₂ y BC₂S₁, se identificó un QTL principal para incidencia de la enfermedad (QTL-2h). Además de este QTL, se identificaron otros "supuestos" loci QTL para incidencia de la enfermedad. Utilizando esta información se seleccionaron cofactores para realizar un procedimiento de 'mapeo de QTL múltiple' (MQM) restringido en el conjunto de datos de F₂. En este análisis, se

identificó un loci QTL “secundario” adicional para incidencia de la enfermedad (QTL-4h). Un QTL se denomina “secundario” cuando su valor está por debajo del umbral de significación de LOD 3.4. Se cree, sin embargo, que los efectos son efectos de QTL reales.

5 QTL-4h está ubicado en el cromosoma 4 y reduce la incidencia de la enfermedad (véase la tabla 1). El QTL tiene un valor LOD de 2,9 y está acoplado a los siguientes marcadores AFLP: P18M51-169.5e, P18M51-305.4h, P14M60-262.9e, y P14M61-292.7h. El efecto positivo de este locus se deriva del progenitor resistente *L. hirsutum*. El efecto positivo se identificó tanto en la población F₂ como en la BC₂S₁. Este QTL se identificó inicialmente en la población BC₂S₁ que carece de segregación de QTL-2h y también está acoplado a los marcadores AFLP P14M48-345e, P14M48-177e y P18M50-147e. La segregación del marcador CAPS codominante para esta región se evaluó en ambas poblaciones BC₂S₁ y la población F₂ para loci ubicados tanto en el cromosoma 2 como en el cromosoma 4. El marcador CAPS en el cromosoma 2, AT4G30930, está ligado estrechamente al QTL en el cromosoma 2 mientras que para el cromosoma 4 se analizaron los datos de segregación para un conjunto de 10 marcadores CAPS distribuidos igualmente en este cromosoma. El análisis de ANOVA, que incluye el marcador CAPS AT4G30930 y el marcador CAPS TG609 en el cromosoma 4 mostró que el marcador CAPS TG609 está ligado significativamente al rasgo de incidencia de la enfermedad.

Para verificar el efecto de cada QTL “secundario”, pueden desarrollarse líneas casi isogénicas (NIL) para las regiones que contenían el efecto de QTL. En paralelo a esto, puede desarrollarse una población de línea endogámica de retrocruzamiento (BIL) de *L. hirsutum* LYC 4/78 en un contexto genético de *L. esculentum* cv. Moneymaker.

3.9 Conclusiones del ensayo de enfermedad y mapeo de QTL

El bioensayo para medir resistencia a *B. cinerea* ha demostrado ser una valiosa herramienta. Sin embargo, una variación aún grande y desconocida parece influir en el desarrollo del avance de la infección. Esta gran variación no genética puede minimizarse utilizando procedimientos estandarizados y realizando muchas repeticiones independientes. La variación puede ser provocada por las condiciones de invernadero que cambian de semana a semana (longitud del día, horas de luz solar y temperatura) causando diferencias en las condiciones fisiológicas del tallo. Además, pequeñas variaciones en la preparación del inóculo fúngico pueden desempeñar un papel en la variación del proceso de infección. Otra observación es que el desarrollo de la enfermedad también puede resultar afectado por el microclima en las bandejas en las que se colocaron los trozos del tallo. Se utilizaron diez bandejas experimentales diferentes para los bioensayos de BC₂S₁. Se utilizó análisis estadístico para compensar la variación entre y dentro de los experimentos. Los experimentos con la incidencia de la enfermedad promedio más elevada fueron los más informativos para medir el crecimiento de la lesión mientras que experimentos con una incidencia de la enfermedad más moderada fueron más informativos. La incidencia de la enfermedad y el crecimiento de la lesión son rasgos independientes, dado que no podía observarse ninguna correlación lineal entre los dos rasgos.

Se identificaron loci de rasgo cuantitativo para resistencia contra *B. cinerea* en tomate en la F₂. Estos QTL identificados se confirmaron en poblaciones BC₂S₁ y explicaban el 46% y el 33% de la variación parental para incidencia de la enfermedad y crecimiento de la lesión, respectivamente. Estos resultados sugieren que no todos los QTL que otorgan resistencia a *B. cinerea* se detectaron en la población de mapeo F₂ original. En ambas poblaciones BC₂S₁ se descubrieron plantas con niveles de resistencia más elevados que el progenitor resistente LYC 4/78. Esto es indicativo de la presencia de loci de resistencia adicionales que segregan en la población BC₂S₁. Una segregación de resistencia adicional era sorprendente debido a que puede haberse esperado que partes ya grandes del genoma de las dos poblaciones BC₂S₁ fueran homocigóticas para Moneymaker.

3.10 Confirmación del efecto de QTL individuales en condiciones de invernadero

Se colocaron plantas que contenían cualquiera de los QTL descritos anteriormente en un contexto de *L. esculentum* utilizando el método descrito en la figura 2. Se colocaron líneas BC₂S₂ en el invernadero en tierra y se cultivaron en condiciones de práctica estándar en los Países Bajos. Después de 3 meses a las plantas se les inoculó colocando un disco de agar que contenía *Botrytis* en una herida en el tallo principal. La herida se cerró posteriormente utilizando Parafilm®. Tres semanas después de la inoculación, se midió la longitud de la lesión del tallo (en cm) (Para más detalles véase más adelante). Los resultados se enumeran en la tabla 10. Claramente, las líneas que contenían el QTL para crecimiento de la lesión muestran una reducción extrema del tamaño de la lesión.

Tabla 10: Longitud de la lesión del tallo promedio de lesiones por *Botrytis cinerea* en plantas adultas de *L. hirsutum* número de registro de adquisiciones LYC 4/78 y *L. hirsutum* LA 1777, tres semanas después de la inoculación.

Línea	Repetición	Longitud de la lesión del tallo promedio (cm)	Desv. est.	Contexto	Comentarios/QTL
21	a***	4,2	1,1	GT	Control susceptible
21	b	3,6	0,9	GT	Control susceptible

ES 2 436 094 T3

Línea	Repetición	Longitud de la lesión del tallo promedio (cm)	Desv. est.	Contexto	Comentarios/QTL
22	a	3,0	0,0	Durintha	Control parcialmente resistente
22	b	5,0	2,9	Durintha	Control parcialmente resistente
23	a	5,6	3,0	Tradiro	Control susceptible
23	b	6,0	3,3	Tradiro	Control susceptible
26	a	3,2	0,8	BChirs3	QTL-2h
26	b	2,6	0,9	BChirs3	QTL-2h
26	c	2,6	1,3	BChirs3	QTL-2h
26	d	3,2	2,2	BChirs3	QTL-2h
28	a	2,6	0,5	BChirs5	QTL-1h
28	b	2,0	0,0	BChirs5	QTL-1h
28	c	2,0	0,0	BChirs5	QTL-1h
28	d	2,0	0,0	BChirs5	QTL-1h
373	e	4,3	0,6	LA 1777	QTL-10 que contiene la fuente del documento WO02/085105
373	f	4,3	0,2	LA 1777	QTL-10 que contiene la fuente del documento WO02/085105
374	e	4,8	0,6	BC chrs 10	Línea introgr. de <i>L. esculentum</i> x LA 1777
374	f	4,5	0,0	BC chrs 10	Línea introgr. de <i>L. esculentum</i> x LA 1777
375	e	4,2	0,3	BC chrs 10	Línea introgr. de <i>L. esculentum</i> x LA 1777
375	f	4,2	0,2	BC chrs 10	Línea introgr. de <i>L. esculentum</i> x LA 1777
376	e	4,3	0,3	BC chrs 10	Línea introgr. de <i>L. esculentum</i> x LA 1777
376	f	5,0	0,7	BC chrs 10	Línea introgr. de <i>L. esculentum</i> x LA 1777
377	e	4,2	0,3	BC chrs 10	Línea introgr. de <i>L. esculentum</i> x LA 1777
377	f	4,3	0,2	BC chrs 10	Línea introgr. de <i>L. esculentum</i> x LA 1777
378	e	4,8	0,2	BC chrs 10	Línea introgr. de <i>L. esculentum</i> x LA 1777
378	f	4,6	0,4	BC chrs 10	Línea introgr. de <i>L. esculentum</i> x LA 1777
68	e	2,0	0,0	parv1	QTL-3p + QTL-4p
68	f	2,0	0,0	parv1	QTL-3p + QTL-4p

Línea	Repetición	Longitud de la lesión del tallo promedio (cm)	Desv. est.	Contexto	Comentarios/QTL
78	e	2,0	0,0	parv2	QTL-9p + QTL-4p
78	f	2,0	0,0	parv2	QTL-9p + QTL-4p
<p>***) a, b, c y d son repeticiones con lo cual cada repetición representa 5 plantas; e y f son repeticiones con lo cual cada repetición representa 3 plantas; GT es Moneyberg con resistencia a TMV; Durintha es un híbrido con resistencia parcial según los cultivadores; Tradiro es un híbrido susceptible a <i>Botrytis</i> según los cultivadores; BChirs indica líneas de retrocruzamiento resultantes de introgresiones de <i>L. hirsutum</i> LYC 4/78; LA 1777 es el número de registro de adquisiciones de especie silvestre <i>L. hirsutum</i> LA 1777; BC chrs 10 indica líneas de retrocruzamiento con introgresión en el cromosoma 10 de <i>L. hirsutum</i> LA 1777; parv indica líneas que resultan de introgresiones de <i>L. parviflorum</i>.</p>					

3.11. El nivel de resistencia a *Botrytis* otorgado por QTL de *L. hirsutum* LYC 4/78 es más elevado que el nivel de resistencia otorgado por QTL de *L. peruvianum* LA 1777 en el cromosoma 10.

- 5 El nivel de resistencia en plantas que contienen los QTL de *L. hirsutum* LYC 4/78 descritos en el presente documento se comparó con el de *L. hirsutum* LA1777, la fuente del documento WO02/085105 que contiene un QTL para resistencia parcial a *Biotrytis* en el cromosoma 10, y a líneas de introgresión derivadas de éste con introgresiones en el cromosoma 10.
- 10 Las líneas se colocaron en el invernadero en suelo y se cultivaron en condiciones de práctica estándar en los Países Bajos. Después de 3 meses a las plantas se les inoculó colocando un disco de agar de 0,5 cm x 0,5 cm que contenía *Botrytis* en una herida del tallo vertical de 2 cm de longitud en el tallo principal. La herida se cerró posteriormente utilizando Parafilm®. Tres semanas después de la inoculación, se midió la longitud de la lesión (en cm) en el tallo (longitud de tejido descolorido manchado con crecimiento fúngico) desde la parte superior de la lesión a la parte inferior de la lesión. Los resultados se enumeran en la tabla 10. Se observó que las líneas que contenían los QTL de *L. hirsutum* LYC 4/78 mostraban un nivel más elevado de resistencia a *Botrytis* que la fuente LA 1777 y las líneas IL. Adicionalmente, las líneas de *L. parviflorum* que contenían la combinación de cualquiera de los QTL para incidencia de la enfermedad en el cromosoma 4 y la de crecimiento de la lesión en el cromosoma 9 (línea 68), de la combinación de ambos QTL para incidencia de la enfermedad en el cromosoma 3 y el cromosoma 4 (línea 78) se compararon con la de fuente LA 1777 y las líneas IL. Las líneas anteriores mostraban menos crecimiento de la lesión en el tallo y, por lo tanto, muestran un nivel más elevado de resistencia a *Botrytis* que las líneas derivadas de LA 1777 (véase la tabla 10). Cuando se registra una longitud de la lesión de 2,0 cm, solamente la herida original podía medirse y no se observaba ningún crecimiento fúngico, lo que indica un nivel de resistencia más elevado. Por lo tanto, una longitud de la lesión del tallo de 2 cm indica ausencia de crecimiento neto.
- 25 Secuencias de marcadores tal como se utilizan en el presente documento.
- Las siguientes tablas dan a conocer información detallada sobre los diversos marcadores RFLP y COS-II tal como se indica en los diversos mapas de ligamiento y tal como se indica para asociación con los QTL tal como se ha descrito.
- 30 La información se copió directamente en la base de datos de la red *SOL Genomic Network* (SGN) alojada en Cornell University, versión del 7 de octubre de 2005.

Tabla 11

TG301 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: TG301

Tamaño del inserto: 750

Vector: pGEM4Z

Sitio de corte: PST1

Resistencia a fármacos: AMP

Listado de Secuencias

Secuencia directa

TTGTAACCTTACTAAATTAAGAGCTCAGGATGAACAGAACACGAATTATTAGTTCATATTAA
 GCAAGAACTTAAAAAAGCTTACCTTCTC
 CAACATACTCTACAACAACTCTTTTGTCTTGATATCTTCATCTGCCACAATCCCAGTGCC
 ACATTTCTCAGTCTGCACGTTATGAGTCA
 ACAAAGCTTTAGTTTTTTAGATGATTATTGCTTGGTTTTTCAAAGAAACGAAAATAAGAAG
 AATACAAAATAACCAACATTTCTTTACTT
 CTTACCAGATACACAAGTGAATTAATGCAAAAATAGATATGAAAATGTTACCAGCCTG
 CACTTTTGATGCAGATTGTACTTGTTC
 AATTGAAAAGTGTGCAATGGTCATTTTTGGTAAAAGTGAATGTGGTATTTTGAGAAA
 GGATTTATGACGGTCCTTTTGCTTAATTA
 TCCCTCTTATAAACGTTAGTAAAGGC

Secuencia inversa

TATTCTGAATCTGGAAAATTGTTCTGCCAATTTCTTTGACCAACCAGACAATACCCTTTTA
 ATCTAAGACCCTAATTACAAGGTTACTGA
 CAATCACTTTTGACACCAATGTCTTTGATAAAGCACTGTTAAAATTTTCAGATGTGCTTTA
 AACTCTGCATCCTTTTAGGAACTCTTT
 TGTCTACTTTCACTTTTTAAAAGAAAGAACTTAAGGAGAGGACATACTTATTATTTTGC
 TTTTCTATATCAAGTAAAGTGAAGACT
 TCCATTAATTTGCATCCAGCGGATGCTAATGGCTACAACATAGCTACTTTAAGCAAATAGG
 TGATTTGATCAAGATTCTTTACGTTTTCA
 AGATCACAGCAACAAAAGGGTTCCTTAAAACCTAGCCTTTACTAACGTTTATAAGAGGG
 ATAATTAAGCAAAGGACCGTCATAATC
 CTTTCTCAAATACCACATTCATCAGTTTTTACCA

Tabla 12

TG460 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: TG460
Tamaño del inserto: 2000
Vector: pGEM4Z
Sitio de corte: PST1
Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

CCTTAGTTTTGAAATCTTTAAGTAGCAATTAGTAATCGGTAGCTCTCCAGTATGAAAAGTT
 CATAATCACTTGGTGGATCTCTTATTATT
 TGCATCATTGTGTGCAATAGGCATAAGAGGTAGTCATTTACAATGCCTCTGAAATGTGT
 GCATTGACATTTGAGAACACTTGAGGATG
 GGATACACTCTCTGTCATCAGGAAGTACTTAGGTGACAAATAGATGTGAAGATTCACGGCA
 TAGTGTCTTTTGATCCATATCATAACCAG
 AAAGTGAGTATCCCCATTTCTCACATTAGCTATATGAAGGAAGAAAGGGAAAACAAAGGAA
 AGCGCTACCCTTATTCGTCGAAAGCTAGC
 CTTTCATGATAACCAAATGAAATTAGAAAAATTAAGAAGCTTTGCTATAGCTTCAAAGAAA
 TCTTTTAGATTCTTGTTTACAAAGTTTTG
 CTGATCTTTCTTACAT

Secuencia inversa

TTATGATGCTCAAATTTCTTATTTTAGACAGACTCGAAATGTGACTATTCCAGAGAAAA
TAAACAAGATCCCTCGGGACACTGAACCT
GAGAACAGGTTCAAATCCCTACTGTACCCCAACAGACAAAGGGAAGAGAGAGCTATCAGT
TTCTCTTTGGTTTGAGAAAAACATAATA
GTATGGAGTGTACCAGATGCTTCAGGATTTTCAGACATGTTCTGACTTGTTACCTAATGTAT
TTGATTCATAGTATAAATCTTAGGTGTT
CTGCTTGACTAGAAGTATGGAAAGTCATTCTTGTGAGTAGTCAGTCTTGAGATATAAGATA
TAATTTGATATACATCTAAATAGATCTTG
GATTCATTAGATAAGTTCAACAAGCATGGGTCAATAAGCACATTGATCAATTACAGGATGT
AGAATAACTTTGCTTATTGTGAAATCCTC
AAAAATGAATGATGCAGGCAAGAAGTGCAAATTACC

Tabla 13

TG55 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: TG55
Tamaño del inserto: 1800
Vector: pUC
Sitio de corte: PST1
Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

TGGATTCAGTGTGAAGAAAGGGGACATGGTGAGTTACCTACCATATGCAATGGGAAGAATG
AAATTTATATGGGGCGATGATGCAGAAGA
ATATACACCGGAGAGATGGCTTGATGGGGACGGTTTCTTCAGGCAATACAATCCCTTCAA
TTTACAGCTTTCCAGGGTGTGTTTGAAGCT
CATCATAAGCTTTGATTATCATTGTTAAAGCCTTGAACGCAAGTCTATACTTAACTTGC
CTAGAGCTATGTAAGTGTGACATATGATC
AATTAACTAAGCACATTCTTTTGTAAATAAAACAGGCAGGGCCAAGGATTTGCTTGGGAAA
GGAGTTTGCTTATAGGCAAATGAAGATAT
TCTCTGCTGTTTTATTACATCACTTCGTTTTCAAGCTGAGTGATGACAACAAGGCTACCAA
CTACAGGACAATGATTACTCTTCACATTG
ATGGGGGATT

Secuencia inversa

GATCCAAAATATGCTTTTCTGATGACCCTTACCAGATGGATTCAGTGTGAAGAAAGGGGAC
ATGGTGAGTTACCTACCATATGCAATGGG
AAGAATGAAATTTATATGGGGTGATGATGCAGAAGAATATAAACCGGAGAGATGGCTTGAT
GGGACGGTTTCTTCAGGCAAGAGAATCC
CTTCAAATTTACAGCTTCCAGGTTGTTTTAAAGCTCATCATAAGCTTTGATTATCATTTT
GTTAAAGCCTTGAACGCGAGTCTATACTT
AACTTGCCTAGTGCTATGTACTGTCGTCATATGATCAATTAACATAAGCACATTCTTTTGT
AATAAACAGGCAGGGCCAAGGATTTGCT
TGGGAAAGGAGTTTGCCTTATAGGCAAATGAAGATATTCTCTGCTGTTTTATTACATCACTT
TGTTTTCAAGTTGAGTGATGACAACAAGG
CTACCAACTACAGGACAATGATTACTCTTCACATTGATGGGGGATTGCATGTTTCGTGTCTT
TAGTA

Tabla 14

TG59 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: TG59
Tamaño del inserto: 3500
Vector: pUC
Sitio de corte: PST1
Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

TCGACCTGCAGATATTTTATAAAAAGAATGCCCCCTGAAGCAGTTGATTTGGTGTCGAGGCT
TCTCCAATATTCTCCAACCTCTACGCTGCA
CTGCTGTAAGTAAAAAGTTTTCTTCTCAATTATCAAGTATTTAGGATATTCTGGTAGTTTC
CCATTTTACCCATCATTCAAACATGGTGT
TCCATTTTTGTTATGTTTTCAATATGCGAGTTCTCATTGATTGTCCTTTTAGCACTTCTGTT
TTCCGGGGATATTGAGAACATTTTGTGTT
TATTGACAGTTGGAAGCATGTGCACACCCTTTCTTTGATTCTTTAAGGGAACCAAATGCTT
GCTTGCCAAATGGGCGACCTCTGCCTCCC
CTATTCAACTTTTCACCTCAAGGTGAGCTTCAGTCTAGCTTTCTCCTTTTATTTACATGA
TTTGATACGTCAAT

Secuencia inversa

AGTTGGGAATTATATCCTGTTTCAGTAGACAAATTACCCAACCAGAATATACGTACCTGAAT
 GTTCATGTGATAGATAAGTCCATACTAGT
 ACTTCTGTCTTGTGAATATCTGTGTGTTGCCTTGTGAGTAAGGATATTCATTGCTCCAATG
 CAAAACCATATATGTCATTGTCTTAGGGAG
 CTTTCTGTTGTTTGTATGGCATGAAAAGTTAATCCTAAAAGAAAGGTAAAGTAAAGGTGCA
 TCCTAGGTTAGTATAATGTTCTGAAGGCA
 AAGATGTTTTCTTTGATTTAACTTATGTTTTTTTTTTCTTTGATTCCGTCTCCTTCCCT
 AATAGCAAAAACCTGGGAAGTTGAACTAC
 GTTATAACTGGACAACCTCATAAATGAAAAAGATGGTAAATAATGCCATTTCTGGGGTGGG
 GTAATTTTCTTAGATGAGTGTGATACTG
 TTGTACCTGTTGCTTGAACCTCCTAAGTTTCTCATTCTTCTTTTGTATTATGCTAAAT
 GCCGTGTGACTGTG

Tabla 15

TG145 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: TG145
Tamaño del inserto: 2480
Vector: pGEM4Z
Sitio de corte: PST1
Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

ATGGGCTATGCTTGGTGCTCTTGGATGTGTCTTCCCTGAGCTATTGGCCCGTAATGGTGTC
 AAGTTCGGTGAGGCTGTGTGGTTCAAGGC
 TGGATCCCAGATCTT CAGCGAGGGTGGACTTGATTACTTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCAT
 GCACAAAGCATCTTGGCCATCTGGGCTTG
 CCAAGTTGTGTTGATGGGAGCCGTTGAGGGATACCGCATTGCTGGTGGACCTCTTGGTGAG
 GTTGTGACCCACTCTACCCCGGTGGCAG
 CTTGACCCATTAGGCCTTGCTGAAGACCCGAGGCATTTGCTGAGCTTAAGGTTAAGGAG
 ATCAAGAACGGCAGACTTGCTATGTTCTC
 TATGTTGGGTTCTTGTTCAGGCCATTGTTACCGAAAGGGTCCATTGGAGAACCTCGCT
 GACCACCTT

Secuencia inversa

GGAGACAACCTTGCATGCCAGCAGTGGATCACCTCGAGTCCACGGTTCTTGGCAAAGGTTT
 CTGGATCTGCTGAAAGTCCAGCGGTGTCC
 CACCCGTAGTACCAGGGAATTCACCATCAAGTAGCTAGGGGACTCACCAGAGAATGGAC
 CCAAGTACTTAACACGGT CAGGGCCATA C
 CATGGGCTGCTAGATGGGGCTGACTTTGCGACAGCCTTTCTCATAGTGATCCTTCCATTT
 CTGTGATTTCTGAGGCAGATGGTAAGAGT
 TTCACTGCTTGTCCAGCAAAAGAAGGGGAAGAAAGAGCCATTGTAGCAGCTGCCATGGTGT
 TTATATCAAGAGAAATGTAAGTGTGTTGAT
 GGTATGAGATATTGTTGAAGTTGGCTGTAATGAGATGAAGTTACAAGGAATTAATTCACCA
 TATATATAGGGAGTAATTAAGAGGGAAAG
 AGTCCAAATTATCTAATGATATCTATATCTA

Tabla 16

CT128 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: CT128

Tamaño del inserto: 700

Vector: pBLUESC

Sitio de corte: EcoR1

Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

CTTTTTTTTTTTTCAACACAAACAAAATTTTATTATATTGTCAGGTAGCACACTACATCT
 TTACTACTGTCATCAAACGACCAGAGACTT
 GAGAACGTTTTAAGAGATTCATTTTCCGGGGACAAAGTTTGTGGCGAAAGCCCAGGCATTG
 TTGTTTACGGGGTCTGCAAGGTGGTCAGC
 AAGGTTCTCCAATGGACCCTTCCGGTGACAATAGCTTGAACAAAGAATCCAAACATAGAG
 AACATAGCAAGTCTACCGTTCTTGATCTC
 CTTTACCTTGAGCTCAGCAAATGCCTCTGGGTCTTTCAGCAAGGCCTAATGGGTCTGAAGCTG
 CCACCAGGGTAGAGTGGGTCTGACAACCTC
 ACCAAGAGGTCCACCAGCAATACGGTATCCCTCAACAGCTCCCATCAACACAACCTTGGCAA
 GCCCAGATGGCCAAGATGCTTTGTGCATG
 GACCAAGCTTGGGTTGCCAAGTAGTCAA

Secuencia inversa

CTGGTGATTACGGGTGGGATACCGCTGGACTTTCAGCAGACCCTGAACTTTTGCCAAGAA
 CCGTGAACCTTGAGGTGATCCACTGCAGAT
 GGGCTATGCTTGGTGCTCTTGGATGTGTCTTCCCTGAGCTCTTGGCCCGTAATGGTGTCAA
 GTTCGGTGAGGCTGTGTGGTTCAAGGCCG
 GATCCCAGATCTTTCAGTGAAGGTGGACTTGACTACTTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGC
 ACAAAGCATCTTGGCCATCTGGGCTTGCC
 AAGTTGTGTTGATGGGAGCTGTTGAGGGATAACCGTATTGCTGGTGGGACCTCTTGGTGAGG
 TTGTGACCCACTCTACCCTGGTGGCAGC
 TTCGACCCATTAGGCCTTGCTGAAGACCCAGAGGCATTTGCTGAGCTCAAGGTAAAGGAGA
 TCAAGAACGGTAGACTTGCTATGTTCTCT
 ATGTTTGGATTCTTTGTTCAAGCTATTGTCACCGGAAAGGGTCCA

Tabla 17

C2_At4g30930 marcador COS-II

Experimentos de mapeo

Mapa: Tomato-EXPEN 2000

Cebador directo (5'' 3''):

ATCATACCTTCTCTCTCCAAACCC

Cebador inverso (5''-3''):

TCGCCATTGCTCACTTTAAACTG

Temperatura: 55°C

Concentración de Mg⁺²: 1,5 mM

Tamaños del producto de PRC

LA716: 700

LA925: 700

Tamaños de banda digerida (utilizando DpnII)

LA716: 380+220

LA925: 340+220

Ubicaciones mapeadas

Mapa	Cromosoma	Desviación	Confianza
Tomato-EXPEN 2000	2	63,5	I

Tabla 18

C2_At2g18030 marcador COS-II

Experimentos de mapeo

Mapa: Tomato-EXPEN 2000

Cebador directo (5'&-3'&):

TTGGGCGACCGCTGAATC

Cebador inverso (5'&-3'&):

TTACCCACATCAGGACCTTGCC

Temperatura: 55°C

Concentración de Mg⁺²: 1,5 mM

Tamaños del producto de PRC

LA716: 1300

LA925: 1200

Tamaños de banda digerida (utilizando diferencia de amplicones)

LA716: 1300

LA925: 1200

Ubicaciones mapeadas

Mapa	Cromosoma	Desviación	Confianza
Tomato-EXPEN 2000	2	83,1	I

Tabla 19

C2_At5g64670 marcador COS-II

Experimentos de mapeo

Mapa: Tomato-EXPEN 2000

Cebador directo (5'&-3'&):

TGATAAATGCTGGGAAGATTGACTC

Cebador inverso (5'&-3'&):

ATCAACCTGGCTCCATCTTCTATTTG

Temperatura: 55°C

Concentración de Mg⁺²: 1,5 mM

Tamaños del producto de PRC

LA716: 200

LA925: 220

Tamaños de banda digerida (utilizando diferencia de amplicones)

LA716: 200

LA925: 220

Ubicaciones mapeadas

Mapa	Cromosoma	Desviación	Confianza
Tomato-EXPEN 2000	2	76	CF(LOD3)

Tabla 20

TG609 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: TG609

Tamaño del inserto: 1900

Vector: pGEM4Z

Sitio de corte: PST1

Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

GAGACAGCTTGCATGCCTGCAGAGGTGATAAATTCACCAAGGTTTCATATTTAGGAAACAA
 GAAAATTAAGATCATTAACACAGATGA
 AAGGATATGACTAGGAGGCAATGACTGATCTTTGACTATCAAATACTTCTCAGGGAAACAA
 TGTGAATGGGCTTTTACATGCAGAGATAT
 TGATTGTGATCATGTTGAAGA ACTTAGGAAACATGAAATTAATGATCATTAACACTGATG
 CAAGGATATGCCAAGTAGGCAAGCAAATT
 AAGGTTGAACATAAATGTCTGTGATCTTTGACTATCAAATATCTTCTCAGAAAAAAAAATG
 TGAATGCTCATTTACATGCAGAGATGGCT
 ATTGTGATCATGTGGCTCAGCCTTGAGTCTATATTGAGGTGCAGACAACATAGTCCCTAAC
 CACATGTGTGATCAAGCAACTTTTTTGT
 GTCCACAGGGTTATAAGTAGGCAACATTTAAGCAAGAAAAACACAGGATCACTATTGAGT
 CAGCTGCTGTTGCCTGT

Secuencia inversa

GGAGACAAGCTTGCATGCCTGCAGAGGTGATAAATTCACCAAGGTTTCATATTTAGGAAAC
AAGAAAATTAAGATCATTAAACACAGAT
GAAAGGATATGACTAGTAGGCAATGACTGATCTTTGACTATCAAATACTTCTCAGGGAAAC
AATGTGAATGGGCTTTTACATGCAGAGAT
ATTGATTGTGATCATGTTGAAGAACTTAGGAAACATGAAATTAATGATCATTAACACTGA
TGCAAGGATATGCCAAGTAGGCAAGCAAA
TTAAGGTTGAACATAAATGTCTGTGATCTTTGACTATCAAATATCTTCTCAGAAAAAAAAA
TGTGAATGCTCATTACATGCAGAGATGG
CTATTGTGATCATGTGGCTCAGCCTTGAGTCTATATTGAGGTGCAGACAACATAGTCCCTA
ACCACATGTGTGATCAAGCAACTTTTTTG
ATGTCCACAGGTTTATAAGTAGGCAACATTTAAGCAAGAAAAACACAGGATCACTATTGA
GTCAGCTGCTGTTGCCTGTTACTGAG

Tabla 21

TG62 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: TG62
Tamaño del inserto: 1800
Vector: pUC
Sitio de corte: PST1
Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

CAAAATGCTTCAGCTACTGGCTAAATGAAGTATGTTCTCAACATATTCACAAGCTTCTGTC
TTCGAAGCTCAAGAAGTGTCGGTATTATC
TGAATTAATAGTAAAGCAAAGAGATGGTTTTATGTTTCTTAAGCAGCATTTCTTAGCTTA
ACGGCCCTCCAGATATATGGTGGACAAAA
TAGAATCCATTAGATATAACAAATGGGATTAGTATAATGATCTTTTACTTTGTTAGATGAT
CATACTAACAGATTGCAAGTTAATCATAT
CCAACATATTTCTGTAGATATTTACATTGGCTAGCATGAGGAAAGGTCATGTAGGAAATTG
AATAGAGTTCAATTTTGGGAAAAGTTGCA
TTGAAGAAGGTAACCTTCAACAAACGTGTGAAAAATCACATTTGAGTTGCCCGCTCACCAT
CGTGATTCCAGTACGAACACTCAAAAAT
TTACTTTTGGAGCCTTAAACATCATTTTAAGCCTTGAAAAGCTGCTTTTGAAGATCTAAG
CAAGAT

Secuencia inversa

GGAGAATATTGTCACTCTATCAGATAGTTCAAACCTATCGGAGAATGAAATGGTCAATTCT
 TCTCACAAGATATTCATGCCTAGTTGCAG
 TGTCCGAATTAACATAACATGCTCAATTTTCATATCTTGCAGCAAATTTATCATTGAAAC
 TCTCTGAGATGGAAACAGAGAACAAAGAC
 CATATTGGAAAGCTTCAATCAGACATGCAGAAAAGGAAGATGAGATTCATGTTTTACGCA
 AGGAAATTGACAATTACACGGAAACAGTG
 GATTCACTGGAGAAGCATGTTACAGAGATTAACAATAAATTGGAGGAGAAAGATCAGCTTG
 TTCAGGAACTTCAGGACAAGGAGAAGCAG
 TTGGAAGCTGACAGAGAAAAGGTTTTTACTACGGATACTTTTAGTTCTACAAATTCTATTA
 TAACCAATACAATGTGTTCAAGTGACTAG
 TGTTTTGCACCTTGTTCAGATTTCAGGCATCTTTGCTTGCTGCTGAAAGCAAGCTCACAGA
 ATCCAAAAGCAGTATGATCAGATGT

Tabla 22

TG555 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: TG555
Tamaño del inserto: 1600
Vector: pGEM4Z
Sitio de corte: PST1
Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

AATTCGGAGCTCACTGCTTCTAATCCTCAGTGAGACTTATTTTCTACATATTAACAATAA
 GAAATTTACGAAGGAATATTATAGACTGA
 ATTCCTGGTGACAAGTATCAAGACATCTTGACCAAGTTTAAAGTTTGTAGTGGCAGTTC
 TTTTAAGCTTTACTTGTGTGAGGTAGACA
 TCAAGGAAGATAAGTAGCAGCTACTCTTCACGGAGCAGCCCATAGGACACTCAAATTCACT
 ATTGCGAGGGTCAATCTACCAATTTATGG
 AACGATACCAGTAAAGTCATTTTTATGTAAACATCAGACAGCTTTTACTAAGCAGAGACA
 TGAATAAGTTCTATTTGTTAGAAGTCGAA
 GAGACAAATAAGTTAATTTACCTATGCTATAAAAGAGGACTCTTATAGTTATAAATACAG
 TACATTTTATTAAGGGTTCTAATTGTTGA
 CTATGATAGCAAGCATGCCGTACTAATT

Secuencia inversa

ACATTTTGAGGAAGACAGGAGTTATGTATCGCCATCTGGTGTGCTCCAAGAACATGACAGA
 TATAAAAGACCGCGGGGTGCACCAGAGAA
 ATGTTGCATTGGAGCATATTGAACATCATAGGCTCAATGGAATTGTTTACTTTGCAGATGA
 TGATAATATCTACTCACTTGAGTTGTTTG
 AGAGCATTAGATCGATCAAGTAAGTTGAGATTCATCAGTCTTGTTTACATGACTTGTCTTT
 GTTTTGTCCTGCTGTGAGCATGTTGAGGA
 TGATGTTATGTGCTTTATGTAGATGTTCAAGTCGATAATAGTGAATAGTCTAGAGCTATTT
 CACATATATTACAACCTTCACTAACAATTT
 CTTTTCTGGTGTCTCGGTTTCATCACTCTTCATAGTTATAAGAATAACAGTTGTAGATTA
 GACCACTGGTTCGTGTGATTTTTGGACTTA
 ATTATTATCTCAATTTCTCCTCAAATAGCAGTCCTTAGATTAGAAGCTGAGG

Tabla 23

CT50 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: CT50

Tamaño del inserto: 1600

Vector: pBLUESC

Sitio de corte: EcoR1

Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

CTTTTTTTTTTTTTTATATATTGTGGTATAGATTATTATATAATAACAAGGTGAATTAAC
 ATGAGAAATGAATAATTGTCACATTCTTG
 TTCTGTCCATTTTCCAGTAGCGGCTAGTTGGAAAATTTGTTGTAACATGTAACACAGGCTG
 TCCACATTCTACTCCAGAGAGAAAAGTTGG
 TAAGTAGTGGGGGCAAAGATAGAGACCCCAATAGCTATCAATTCACCTTGTGACAATCA
 AGATTTGAGAAAAAAGATCAAACTTTAC
 CAACTTAGATAGCTCCATAATCAACTGTAGGTACAATTCTTTAGTGAAATTGCGGCGTTCA
 TCTTCTGGGGACGAAGAGTAAGTAGACAA
 TCAATTGTCTTGTAGAAGTTGGGCTTTACCATTTTCCCTAGGACATAAGCTCTTGATCGAA
 GCTTGAAGTTTAATTTTAGTGGCACTGGT
 AATG

Secuencia inversa

TTTTTTTTTTTTTTTAGCCAAAATGCATACAAAACTGATTCAGAAGATACGAGCTTGGCT
 CCTTCGTCGCCGGACAATAGAGGGCCGAC
 GGCGTATTACGTTTACAGAGTCCGTACCGTATTCTCACGATGGCGAGAAGACAACGACGTCG
 TTTCACTCTACTCCTGTTATCAGTCCCAT
 GGGTTCTCCTCCTCACTCTCACTCATCCGTGGCCGTCCTCCCGTGATTCTCTTCTCCTCC
 AGATTCTCCGGCTCCCTCAAGCCTGGATC
 TCAGAAGATTTTACCCGACGCCGCCGGAGGCGTCGGCGGCCGTCACCACCGCAAAGGGCAG
 AAGCCCTGGAAGGAATGTGATGTTATTTG
 AGGAAGAAGGACTACTTGAAGATGATAGATCCAGTAAATCTCTTCCACGTCGTTGCTATGT
 CCTTGCTTTTTGTTGTTGGTTTCTTCGTC
 CTTTTCTCCTTCTTTGCTCTCATCCTTTGGGGTGCTAGTCGACCTC

Tabla 24

C2_At1g74970

marcador COS-II

Experimentos de mapeo

Mapa: Tomato-EXPEN 2000

Cebador directo (5''-3''):

TCATCATCAACTATCGTGATGCTAAG

Cebador inverso (5''-3''):

ACGCTTGCGAGCCTTCTTGAGAC

Temperatura: 55°C

Concentración de Mg⁺²: 1,5 mM

Tamaños del producto de PRC

LA716: 1000

LA925: 1000

Tamaños de banda digerida (utilizando Alul)

LA716: 550

LA925: 850

Ubicaciones mapeadas

Mapa	Cromosoma	Desviación	Confianza
Tomato-EXPEN 2000	4	109,7	1

Tabla 25

CT128 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: CT128

Tamaño del inserto: 700

Vector: pBLUESC

Sitio de corte: EcoR1

Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

```
CTTTTTTTTTTTTCAACACAAACAAAATTTTCATTATATTGTCAGGTAGCACACTACATCT
TTACTGTCATCAAACGACCAGAGACTT
GAGAACGTTTTAAGAGATTCATTTCCGGGGACAAAGTTTGTGGCGAAAGCCCAGGCATTG
TTGTTTACGGGGTCTGCAAGGTGGTCAGC
AAGGTTCTCCAATGGACCCTTTCCGGTGACAATAGCTTGAACAAAGAATCCAAACATAGAG
AACATAGCAAGTCTACCGTTCTTGATCTC
CTTTACCTTGAGCTCAGCAAATGCCTCTGGGTCTTCAGCAAGGCCTAATGGGTCTGAAGCTG
CCACCAGGGTAGAGTGGGTCGACAACCTC
ACCAAGAGGTCCACCAGCAATACGGTATCCCTCAACAGCTCCCATCAACACAACCTTGCAA
GCCAGATGGCCAAGATGCTTTGTGCATG
GACCAAGCTTGGGTTGCCAAGTAGTCAA
```

Secuencia inversa

CTGGTGATTACGGGTGGGATACCGCTGGACTTTCAGCAGACCCTGAAACTTTTGCCAAGAA
 CCGTGAACCTTGAGGTGATCCACTGCAGAT
 GGGCTATGCTTGGTGCTCTTGGATGTGTCTTCCCTGAGCTCTTGGCCCGTAATGGTGTCAA
 GTTCGGTGAGGCTGTGTGGTTCAAGGCCG
 GATCCCAGATCTTCAGTGAAGGTGGACTTGACTACTTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGC
 ACAAAGCATCTTGGCCATCTGGGCTTGCC
 AAGTTGTGTTGATGGGAGCTGTTGAGGGATACCGTATTGCTGGTGGGACCTCTTGGTGAGG
 TTGTCGACCCACTCTACCCTGGTGGCAGC
 TTCGACCCATTAGGCCCTTGCTGAAGACCCAGAGGCATTTGCTGAGCTCAAGGTAAGGAGA
 TCAAGAACGGTAGACTTGCTATGTTCTCT
 ATGTTTGGATTCTTTGTTCAAGCTATTGTCACCGGAAAGGGTCCA

Tabla 26

TG599 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: TG599
Tamaño del inserto: 700
Vector: pGEM4Z
Sitio de corte: PST1
Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

TGCTTTGAGACAGATGTCTCTCATTAAAGTGACTGAAGCTTTCTTCTAGTTGGCTAGCATAT
 TCATTTTCAGCATATAATCTGTATCATGA
 ACAAATTTGCGACAGTATTGAATTTTTATTGTTGAATAGTCTTTTTATTATCCCCGAAGTT
 GAGGGTGGAACTTACATTTTCTGTTGATC
 CTTGCTTGTGTTTTTGTAAACAAAAAGCGTCACCCATTATTTTTCTTTTATTCTTTCTA
 GGTGGGACTAAGATTTTTTGAATGAGA
 AAGGTATTCGCTACCTTGAGGGCTGTGGTTGAAGTGATGGAGTATCTGAGCAAAGATGCAG
 CTCCTGATGGTGTGGGAAGGCTTATAAAG
 GAGGAGGGAGTATTTCCCTTTCATTTCTTTGTATTTCCGTGTGTGTATAGTCCGGAAGTGGT
 TCCCTACTTATGAATTCTTTCATGGTTTG
 GTCAATTGAGAAGGATCAAGAAATCTGATGCTACTTTATCATGGGAACTT

Secuencia inversa

GCTTGCATGCCTGCAGAGTGGTCATACAATAAAAGGTAAAAATCAACATTCTTACCTCTGG
 AAAGAAACCAATAGCATTGGTCAATGATG
 CTGCCTCTAGAGGAACAATATTGTATGGTGAAGTTCCCCTGATAAAGTAGCATCAGATTT
 CTTGATCCTTCTCAACTGACCAAACCATG
 AAAGAATTCATAAGTAGGGAACCAGTCCGGACTATACACACACGGAAATACAAAGAAATG
 AAAGGAAATACTACCTCCTCCTTTATAAG
 CCTTCCCACACCATCAGGAGCTGCATCTTTGCTCAGATACTCCATCACTTCAACCACAGCC
 CTCAAGGTAGCGAATACCTTTCTCATTTT
 AAAAAATCTTAGTCCCAACCTAGAAAGAATAAAAGAAAAATAATGGGTGACGCTTTTTTGT
 TTACAAAAACAGCAAGCAAGGATCAACAG
 AAAATCTAAGTTCCACCCTCAACTTCGGGGATAATAAAAGACTATTCAACAATAAAAAAT
 CAATACTGTGCGCAA

Tabla 27

TG10 marcador RFLP

Información sobre RFLP

Nombre: TG10
Tamaño del inserto: 900
Vector: pUC
Sitio de corte: EcoR1/HindIII
Resistencia a fármacos: AMP

Secuencia directa

AACTCTGCTCTGCCAATAGTAGTCAGGCAGATCAAGATGCTCAAATTTTCTATTTGAATT
 GGAAGCATCAAGATGGTTCTTAGCATTTA
 TTTTAGAAAGACTAACCATATTATCAAATAACCAGACTGAGACGCACACAAAAGTTTCCT
 CTATTATTTTATAATGATGTGAAGATGC
 TACATAATGAGTACACTTTCCTTACTTTACTGCAGATGGACCTACCAGGCCCAAACGGAC
 ATGTAGCTATGACAGAAGAGCAACCGCTA
 TGAATGTCTCAAAGTGTGGCCTAGGCGATCAGCACAGATGATGAATCTGGAAGTACATTC
 CAAGAAGGAAAGCTGGAGCGTGGGAACTA
 ACCAGATGCAGGGGATGAATCCACACCTTTCAGTTGATCATCTGAAGGGAAAATAAGAAT
 TTTTCATGAGAAAATGACTGGCTATTTTCA
 ACTTTG

Secuencia inversa

TTCAATGCATTTAAGCTCAAAAAACAAAGCTGTAGGAAGGAGCATATTAGTAGCCTAACT
 CTGCTCTGCCAATAATAGTTAAGCAGATC
 AAGATGCTCAAATTTTCTAATTGAATTGTTAGCATCAAGATGCTTCTTAGCATTTATTTT
 AGAAAGATTAACCATATTATCAAATAACC
 AGACAGAGACGCACACAAAAGTTTCAATCTATTATTTTATAATGATGTGAAAATGCTACA
 TAATGAGTACACTTTCCTTACTTTACTG
 CAGATGGACCTACCAGGCCCAAACGGTCATGTAGTTATGACAGAAGAACAACAGTATGAAT
 TTCTCAAAGTGTGGCCAAGGTGATCAGC
 AAAGATTATGAATTTGGAAGTACATTCCAAGAGGAAAGCTGGAGCATCGTAACTAACCAGA
 TGCAGGGGATGAATCCACACCTTTCAGTT
 GATCATCTGAAGGCAAAAATAAGAATTTTCATGAGAAAATACTGGTTATTTTCAACTTTGT
 TGGCCAGACGAGGAGTCCAATGGGATAGA
 AGGACTAACTCAATGACGTATG

Tabla 28

TM2a marcador TM

Información sobre TM

Nombre: TM2A
Antigua ID COS: T0899

Secuencia

CNAGCTCGANNNACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGC
 GGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGCTCCTCC
 ATTGAAAAGGGAATCAAGTTTGCCAAAGAAAACAAAAAACAAAATTAT
 GGTCTAGTTTTCTATAGTGACAGTTTTGGATCTTTTTGGGTCAATTGTTT
 TTGTATCCTTTGCAAGTTTCTTGCAGCCGGAGGCTTAGATTTAGCTCTTT
 TGATATTATACCCAACATTTCTACAAAATAATGTATGGCAAACGGGGGC
 CTATCCCATTGTCCTTAGTGTGGAGGTGTTATTCTCACATGAATCGTTTT
 CCAATTATGGTTAGTAGCAGACAATTGATGCAAATGAAGAAATGTTTCAT
 GACCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Ubicaciones mapeadas

Mapa	Cromosoma	Desviación	Confianza
Tomato-EXPEN 2000 (TM2A)	9	50,5	I

Tabla 29

TG551 marcador RFLP

Información sobre RFLP

- Nombre:** TG551
- Tamaño del inserto:** 950
- Vector:** pGEM4Z
- Sitio de corte:** PST1
- Resistencia a fármacos:** AMP

Secuencia directa

AATGAAGTTCAGTTGATAAGCTAAATGGTGGAAATACTAATTTTAATTGACAGTAACTTTG
 CATTTCAGGTCCATACCAAAACATTTGC
 TAACACCAGTTGCTTTGTCAACGAAAACCTTGGCACTCAAACCCTACCAAAAGGCTGAAA
 TGCATTTGCAAGCTCTTGATCACCAAATT
 CTTGAGGAATATGGTAAATAAATAGATTAGCACCAGGTGGACCTGTAAACAGCAAATCGT
 TTTTGATAAGTACAGGTTTATTTCTACAT
 GTTCAACTACCACTGCCAAGTACACTAGTTCAAGTGACATCTCCACCACTTAATTGCATAA
 AGCTTTACCAACGACAAATATAACAACT
 TGTGCAAGTAATTTGAGTTCCTGTCTATACAGTCCAGAATCTCCATATGCTGCTCATCTCA
 CAATGTTGGTTAAGGAAATTTGTCAAGTA
 AAGTTCAA

Secuencia inversa

CATCTTCAAGTGTCAAGTACAGGGGGTCAGGTTGAAGGTTGTTGAACATTTATTTT
 GTGACCTTTTTAGCTCTAGAATTTCTGTA
 GCTAATCAAGTACAGTCCCATAACCTAGGGGCTGTTAGGGTTTTCTGCTGAATGAGGCTGC
 TTGTCCTTTATTTTGGTTAATTATTTTCTG
 GAAATTGTTCCTCGTCATAGAGAATAGAAGTAGAAGAAGAAGATAGTATAATCTATTA
 TATTTGTTTTTTACTTAATTTATAAAGAT
 TCCATAAATGCATGTGATCTTTGATCAATGATATCTTATACAAGTGTATCACTAGAATCTA
 TTATATTTGGATTTACTTATTTTATATAG
 GATTCATAAACGCATGTGATC

REFERENCIAS

- 5 Bai YL, Huang CC, van der Hulst R, Meijer Dekens F, Bonnema G, Lindhout P (2003) QTLs for tomato powdery mildew resistance (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 co-localize with two qualitative powdery mildew resistance genes. *Mol. plant microbe interactions* 16: 169-176.
- Benito EP, ten Have A, van't Klooster JW, van Kan JAL (1998) Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 207-220.
- 10 Bernacchi D, Tanksley SD (1997) An interspecific backcross of *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum*: Linkage analysis and a QTL study of sexual compatibility factors and floral traits. *Genetics* 147: 861-877.
- Christou P, Murphy JE y Swain WF (1987) Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 84: 3962-3966.
- Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for Quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- 15 Deshayes A, Herrera-Estrella L, Caboche M (1985) Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. *EMBO J.* 4: 2731-2737.
- D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992) *Plant. Cell* 4: 1495-1505.
- Dik AJ, Koning G, Kohl J (1999) Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 115-122.
- 20 Doganlar S, Frary A, Ku HM and Tanksley SD (2002) Mapping Quantitative Trait Loci in Inbred Backcross Lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome* 45:1189-1202.
- Draper J, Davey MR, Freeman JP, Cocking EC y Cox BJ (1982) Ti plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid-transformed *Petunia* protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* 23: 451-458.
- Eckstein F (ed) (1991) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach.* Oxford Univ. Press, NY 1991
- 25 Egashira H, Kuwashima A, Ishiguro H, Fukushima K, Kaya T, Imanishi S (2000) Screening of wild accessions resistant to gray mold (*Botrytis cinerea* Pers.) in *Lycopersicon*. *Acta physiologiae plantarum* 22: 324-326.
- Foolad MR, Zhang LP, Khan AA, Nino Liu D, Liin GY (2002) Identification of QTLs for early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using backcross populations of a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross. *Theor. Appl. Genetics* 104: 945-958.
- 30 Fulton T, van der Hoeven R, Eannetta N, Tanksley S (2002). Identification, Analysis and Utilization of a Conserved Ortholog Set (COS) Markers for Comparative Genomics in Higher Plants. *The Plant Cell* 14(7): 1457-1467.
- Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R (1990) Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological Molecular Plant Pathology* 37, 179-191.
- Grandillo S, Tanksley SD (1996) QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* 92: 935-951.
- 35 Gruber MY, Crosby WL (1993) Vectors for Plant Transformation. In: Glick BR and Thompson JE (Eds.) *Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*, CRC Press, págs. 89-119.
- Haanstra JPW, Wye C, Verbakel H, Meijer Dekens F, van den Berg P, Odinet P, van Heusden AW, Tanksley S, Lindhout P, Peleman J (1999) An integrated high density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii* F2 populations. *Theor. Appl. Genetics* 99: 254-271.
- 40 Hain R, Stabel P, Czernilofsky AP, Steinbliss HH, Herrera-Estrella L, Schell J (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene to plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 199: 161-168.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholts D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Jansen RC (1993) Interval Mapping of Multiple Quantitative Trait Loci. *Genetics* 135: 205-211.
- 45 Jansen RC (1994) Controlling the Type I and Type II Errors in Mapping Quantitative Trait Loci. *Genetics* 138: 871-881.
- Kado CI (1991) Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 1-32.
- Klein TM, Gradziel T, Fromm ME, Sanford JC (1988). Factors influencing gene delivery into zea mays cells by high velocity microprojectiles. *Biotechnology* 6: 559-563.
- 50 Klein TM, Arentzen R, Lewis PA y Fitzpatrick- McElligott S (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology* 10: 286-291.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175.

- Laursen CM, Krzyzek RA, Flick CE, Anderson PC, Spencer TM (1994) Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. *Plant Mol Biol.* 24(1): 51-61.
- Miki BL, Fobert PF, Charest PJ, Iyer VN (1993) Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants. In: Glick BR and Thompson JE (Eds.) *Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*, CRC Press, págs. 67-88.
- 5 Moloney MM, Walker JM, Sharma KK (1989) High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports* 8: 238-242. Myburg AA, Remington DL, O' Malley DM, Sederoff RR, Whetten RW (2001) High-throughput AFLP analysis using infrared dye-labeled primers and an automated DNA sequencer. *Biotechniques* 30: 348-357.
- Nesbitt TC, Tanksley SD (2001) fw2.2 directly affects the size of developing tomato fruit, with secondary effects on fruit number and photosynthate distribution. *Plant Physiol.* 127: 575-583.
- 10 Nicot PC, Moretti A, Romiti C, Bardin M, Caranta C, Ferrière H (2002) Differences in susceptibility of pruning wounds and leaves to infection by *Botrytis cinerea* among wild tomato accessions. *TGC Report* 52: 24-26.
- Paterson AH (ed.) (1996) *Genome Mapping in Plants*, Academic Press Inc San Diego, CA, Estados Unidos.
- Phillips RL, Somers DA, Hibberd KA. 1988. Cell/tissue culture and in vitro manipulation. In: G.F. Sprague & J.W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, 3^a ed., págs. 345-387. Madison, WI, Estados Unidos, American Society of Agronomy.
- 15 Pierik RLM (1999) *In vitro Culture of Higher Plants*, 4^a edición, 360 páginas, ISBN: 0-7923-5267-X.
- Prins TW, Tudzynski P, von Tiedemann A, Tudzynski B, ten Have A, Hansen ME, Tenberge K, van Kan JAL (2000) Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In "Fungal Pathology" (J. Kronstad, editor). Kluwer Academic Publishers, págs. 33-64.
- 20 Roupe van der Voort JNAM, van Zandvoort P, van Eck HJ, Folkertsma RT, Hutten RCB, Draaistra J, Gommers FJ, Jacobsen E, Helder J, Bakker J (1997) Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen Genetics* 255: 438-447.
- Sambrook J, y Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nueva York, NY, Estados Unidos., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 25 Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Particulate Sci. Technol.* 5: 27-37.
- Sanford JC (1988) The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6: 299-302.
- Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation. *Physiologica Plantarum* 79: 206-209.
- 30 Sanford JC, Smith FD y Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology* 217: 483-509.
- Steward CN, Via LE (1993) A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14: 748-750.
- 35 Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Tanksley SD, Grandillo S, Fulton TM, Zamir D, Eshed Y, Petiard V, Lopez J y Beck-Bunn T (1996) Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* 92: 213-224.
- 40 Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW (1998) RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Bio/technology* 7: 257-263.
- Tijssen P (1993) Hybridization With Nucleic Acid Probes. Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier.
- 45 Urbasch I (1986) Resistenz verschiedener Kultur- und Wildtomatenpflanzen (*Lycopersicon* spp.) gegenüber *Botrytis cinerea* Pers. *J Phytopathol* 116: 344-351
- Utkhede R, Bogdanoff C, McNevin J (2001) Effects of biological and chemical treatments on *Botrytis* stem canker and fruit yield of tomato under greenhouse conditions. *Can. J. Plant Pathol* 23: 253-259
- Utkhede RS, Mathur S (2002) Biological control of stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Microbiol.* 48: 550-554
- 50 Van Berloo R (1999) GGT: Software for the display of graphical genotypes. *J. Heredity* 90: 328-329
- Van Berloo R, Aalbers H, Werkman A, Niks RE (2001) Resistance QTL confirmed through development of QTL-NILs for barley leaf rust resistance. *Mol. Breeding* 8: 187-195
- Van Heusden AW, Koornneef M, Voorrips RE, Bruggemann W, Pet G, Vrieling van Ginkel R, Chen X, Lindhout P (1999) Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis*. *Theor. Appl. Genetics* 99: 1068-1074
- 55 Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Heredity* 93: 77-78.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.
- 60 Zhang L, Cheng L, Xu N, Zhao M, Li C, Yuan J y Jia S (1991) Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. *Biotechnology* 9: 996-997.

REIVINDICACIONES

1. Planta de tomate de *Lycopersicon esculentum* resistente a *Botrytis*, producida mediante un método que comprende la etapa de transferir desde una planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* a una planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis* un ácido nucleico que comprende un QTL asociado con resistencia a *Botrytis*, en la que dicho QTL está asociado con una incidencia de la enfermedad reducida, en la que dicho QTL es el QTL en el cromosoma 4 de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78, en la que dicho QTL está indicado por marcadores AFLP ligados a dicho QTL, en la que el QTL en los cromosomas 4 de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78 está indicado por los fragmentos de AFLP P18M51-169.5e, P18M51-305.4h, P14M60-262.9e, P14M61-292.7h, P14M48-345e, P14M48-177e y P18M50-147e y el marcador TG609 en el cromosoma 4 de *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78, en la que el fragmento de AFLP:

- P18M51-169.5e puede obtenerse mediante amplificación utilizando los cebadores que tienen las secuencias GACTGCGTACATGCAGCT y GATGAGTCCTGAGTAACCA que dan como resultado un fragmento de ALFP del tamaño aproximado (± 2 pares de bases) de 169,5 tal como se amplifica en *L. esculentum* cv Moneymaker;

- P18M51-305.4h puede obtenerse mediante amplificación utilizando los cebadores que tienen las secuencias GACTGCGTACATGCAGCT y GATGAGTCCTGAGTAACCA que dan como resultado un fragmento de ALFP del tamaño aproximado (± 2 pares de bases) de 305,4 tal como se amplifica en *L. hirsutum* LYC 4/78;

- P14M60-262.9e puede obtenerse mediante amplificación utilizando los cebadores que tienen las secuencias GACTGCGTACATGCAGAT y GATGAGTCCGAGTAACTC que dan como resultado un fragmento de ALFP del tamaño aproximado (± 2 pares de bases) de 262,9 tal como se amplifica en *L. esculentum* cv Moneymaker;

- P14M61-292.7h puede obtenerse mediante amplificación utilizando los cebadores que tienen las secuencias GACTGCGTACATGCAGAT y GATGAGTCCTGAGTAACTG que dan como resultado un fragmento de ALFP del tamaño aproximado (± 2 pares de bases) de 292,7 tal como se amplifica en *L. hirsutum* LYC 4/78;-

El marcador TG609 es el marcador RFLP que puede obtenerse mediante amplificación utilizando el cebador directo que tiene la secuencia (5'-3')

**GAGACAGCTTGCATGCCTGCAGAGGTGATAAATTCACCAAGGTTTCATATTTA
GGAAACAAGAAAATTAAGATCATTAAACACAGATGAAAGGATATGACTAGG
AGGCAATGACTGATCTTTGACTATCAAATACTTCTCAGGGAAACAATGTGAAT
GGGCTTTTACATGCAGAGATATTGATTGTGATCATGTTGAAGAACTTAGGAAA
CATGAAATTAAATGATCATTAACTGATGCAAGGATATGCCAAGTAGGCAAG
CAAATTAAGGTTGAACATAAATGTCTGTGATCTTTGACTATCAAATATCTTCT
CAGAAAAAAAATGTGAATGCTCATTTACATGCAGAGATGGCTATTGTGATCA
TGTGGCTCAGCCTTGAGTCTATATTGAGGTGCAGACAACATAGTCCCTAACCA
CATGTGTGATCAAGCAACTTTTTTGGATGTCCACAGGGTTATAAGTAGGCAACA
TTTAAGCAAGAAAAAACACAGGATCACTATTGAGTCAGCTGCTGTTGCCTGT**

30 y utilizando el cebador inverso que tiene la secuencia

GGAGACAAGCTTGCATGCCTGCAGAGGTGATAAATTCACCAAGGTTTCATATT
 TAGGAAACAAGAAAATTAAGATCATTAAACACAGATGAAAGGATATGACTA
 GTAGGCAATGACTGATCTTTGACTATCAAATACTTCTCAGGGAAACAATGTGA
 ATGGGCTTTTACATGCAGAGATATTGATTGTGATCATGTTGAAGAACTTAGGA
 AACATGAAATTAATGATCATTAACTGATGCAAGGATATGCCAAGTAGGCA
 AGCAAATTAAGGTTGAACATAAATGTCTGTGATCTTTGACTATCAAATATCTT
 CTCAGAAAAAAAATGTGAATGCTCATTTACATGCAGAGATGGCTATTGTGAT
 CATGTGGCTCAGCCTTGAGTCTATATTGAGGTGCAGACAACATAGTCCCTAAC
 CACATGTGTGATCAAGCAACTTTTTTGTGATGTCCACAGGTTTATAAGTAGGCAA
 CATTTAAGCAAGAAAAACACAGGATCACTATTGAGTCAGCTGCTGTTGCCTG
 TTAAGTACTGAG

dando como resultado un fragmento de RFLP de 1900 pares de bases que tiene un sitio de corte PST1;

- 5 - P14M48-345e puede obtenerse mediante amplificación utilizando los cebadores que tienen las secuencias GACTGCGTACATGCAGAT y GATGAGTCCTGAGTAACAC que dan como resultado un fragmento de ALFP del tamaño aproximado (± 2 pares de bases) de 345 tal como se amplifica en *L. esculentum* cv Moneymaker;
- 10 - P14M48-177e puede obtenerse mediante amplificación utilizando los cebadores que tienen las secuencias GACTGCGTACATGCAGAT y GATGAGTCCTGAGTAACAC que dan como resultado un fragmento de ALFP del tamaño aproximado (± 2 pares de bases) de 177 tal como se amplifica en *L. esculentum* cv Moneymaker;
- 10 - P18M50-147e puede obtenerse mediante amplificación utilizando los cebadores que tienen las secuencias GACTGCGTACATGCAGAT y GATGAGTCCTGAGTAACAT que dan como resultado un fragmento de ALFP del tamaño aproximado (± 2 pares de bases) de 147 tal como se amplifica en *L. esculentum* cv Moneymaker;

15 en la que dicha transferencia de dicho ácido nucleico se realiza mediante cruzamiento, mediante transformación, mediante fusión de protoplastos, mediante una técnica de dobles haploides o mediante rescate embrionario, y en la que dicho QTL no está en su contexto genético natural.

20 2. Planta de tomate resistente a *Botrytis*, según la reivindicación 1, en la que dicha planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* se selecciona entre el grupo que comprende *Lycopersicon cerasiforme*, *Lycopersicon cheesmanii*, *Lycopersicon chilense*, *Lycopersicon chmielewskii*, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon hirsutum*, *Lycopersicon parviflorum*, *Lycopersicon pennellii*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lycopersicon pimpinellifolium* y *Solanum lycopersicoides*.

25 3. Planta de tomate resistente a *Botrytis*, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicha planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* es un número de registro de adquisiciones silvestre de *Lycopersicon hirsutum*, más preferentemente *Lycopersicon hirsutum* LYC 4/78.

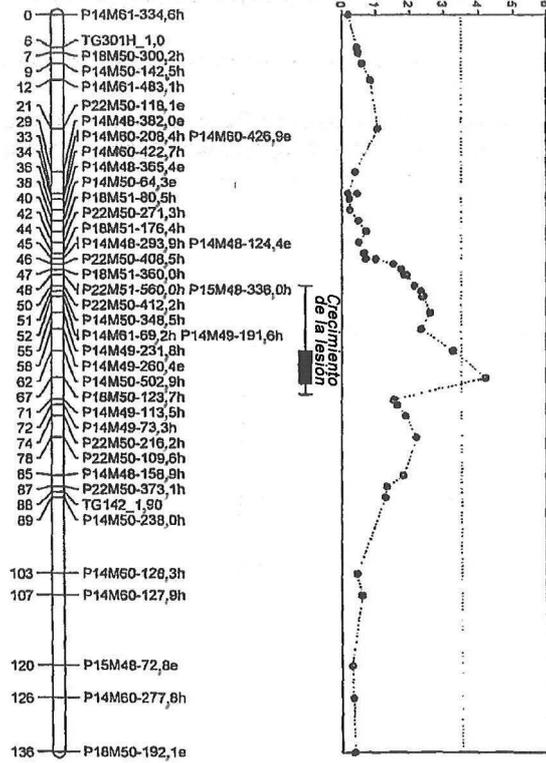
30 4. Planta de tomate resistente a *Botrytis*, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha planta de tomate receptora susceptible a *Botrytis* es una planta de una línea de *L. esculentum* que posee características deseables desde el punto de vista comercial.

35 5. Método de producción de una planta de tomate de *Lycopersicon esculentum* resistente a *Botrytis* que comprende la etapa de transferir un ácido nucleico que comprende, como mínimo, un QTL, según la reivindicación 1, en el que dicho QTL está indicado mediante, como mínimo, un marcador seleccionado entre el grupo que comprende los marcadores, según la reivindicación 1, desde una planta de tomate donadora resistente a *Botrytis* a una planta de tomate de *Lycopersicon esculentum* receptora susceptible a *Botrytis*, en el que dicha transferencia de ácido nucleico se realiza mediante transformación, y en el que dicha transferencia no implica procesos esencialmente biológicos.

40 6. Planta de tomate de *Lycopersicon esculentum* resistente a *Botrytis*, o parte de la misma, que comprende dentro de su genoma un QTL, según la reivindicación 1, asociado con resistencia a *Botrytis*, y en la que dicho QTL no está en su contexto genético natural, y en la que dicho QTL está indicado por los marcadores ligados a dichos QTL, según la reivindicación 1.

7. Planta de tomate de *L. esculentum* híbrida, o parte de la misma, que puede obtenerse cruzando una planta de tomate, según la reivindicación 6, con una planta de tomate que muestra características deseables desde el punto de vista comercial, y que comprende dentro de su genoma dicho QTL, según la reivindicación 1, asociado con resistencia a *Botrytis*.
- 5
8. Semilla de tomate producida cultivando la planta de tomate, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, comprendiendo dicha semilla dentro de su genoma dicho QTL, según la reivindicación 1, asociado con resistencia a *Botrytis*.
- 10
9. Semilla de tomate producida retrocruzando la planta, según la reivindicación 7, con una planta de *L. esculentum* que tiene rasgos fenotípicos deseables para obtener una planta de *L. esculentum* que es resistente a *Botrytis* y tiene rasgos fenotípicos deseables, y recogiendo las semillas producidas por dicha planta, comprendiendo dicha semilla dentro de su genoma dicho QTL, según la reivindicación 1, asociado con resistencia a *Botrytis*.
- 15
10. Utilización de un QTL, según la reivindicación 1, asociado con resistencia a *Botrytis*, y en la que dicho QTL no está en su contexto genético natural, y en la que dicho QTL está indicado por los marcadores ligados a dicho QTL, según la reivindicación 1, para la producción de plantas de tomate de *L. esculentum* resistentes a *Botrytis*, donde dicha utilización no implica procesos esencialmente biológicos.
- 20
11. Utilización de un marcador, según la reivindicación 1, para la detección de plantas de tomate de *L. esculentum* resistentes a *Botrytis*.

Cromosoma 1



Cromosoma 2

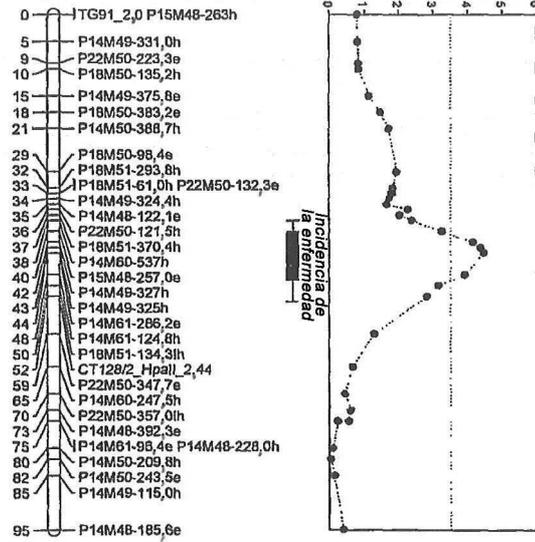


Figura 1

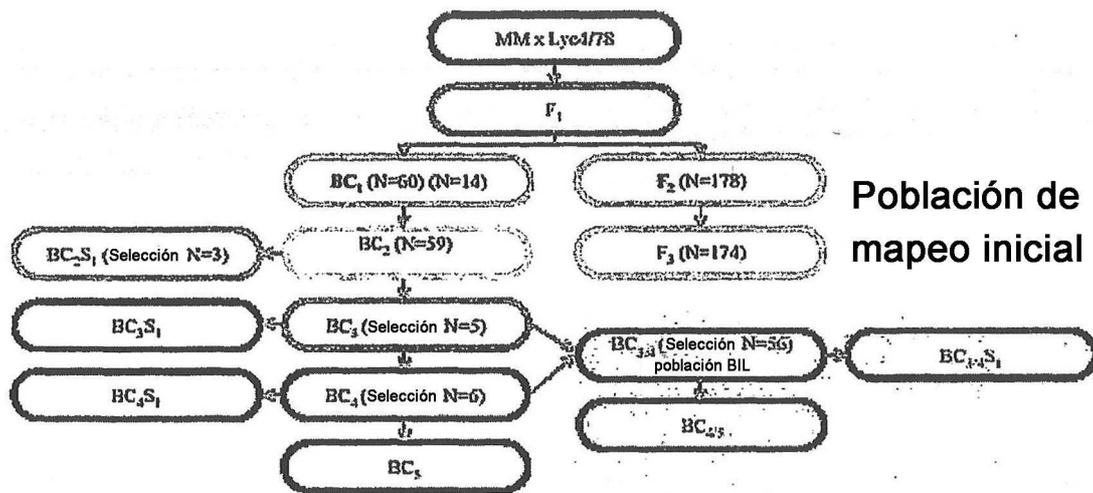


Figura 2

Figura 3

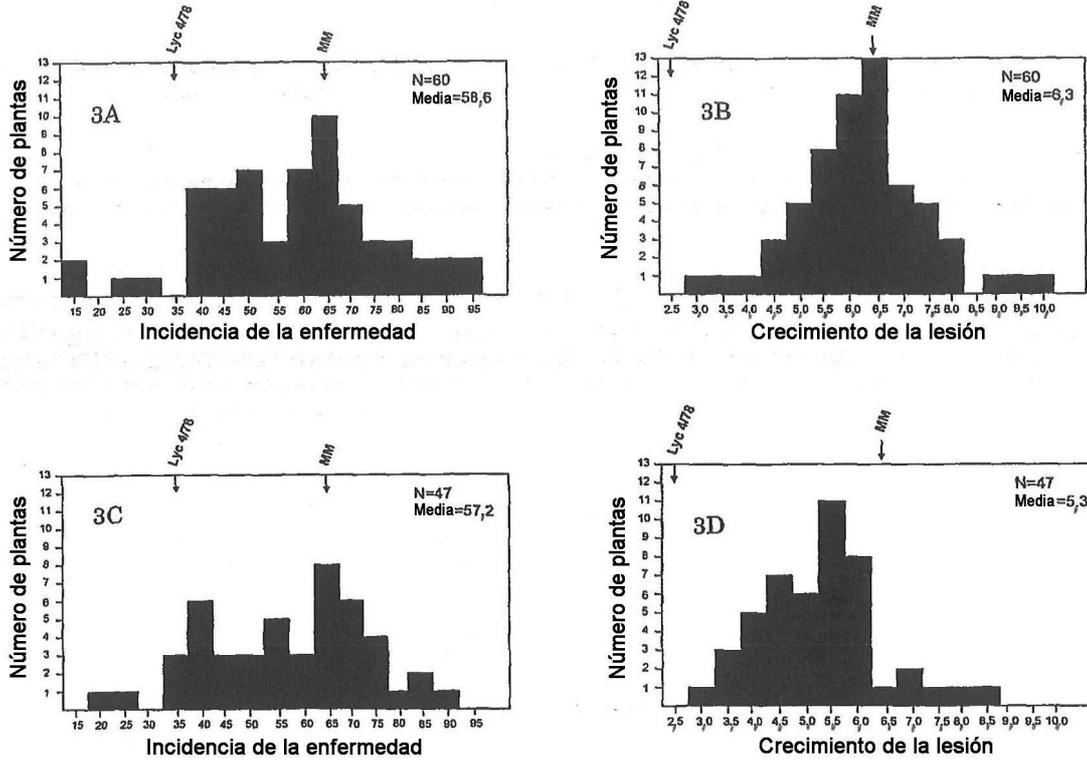
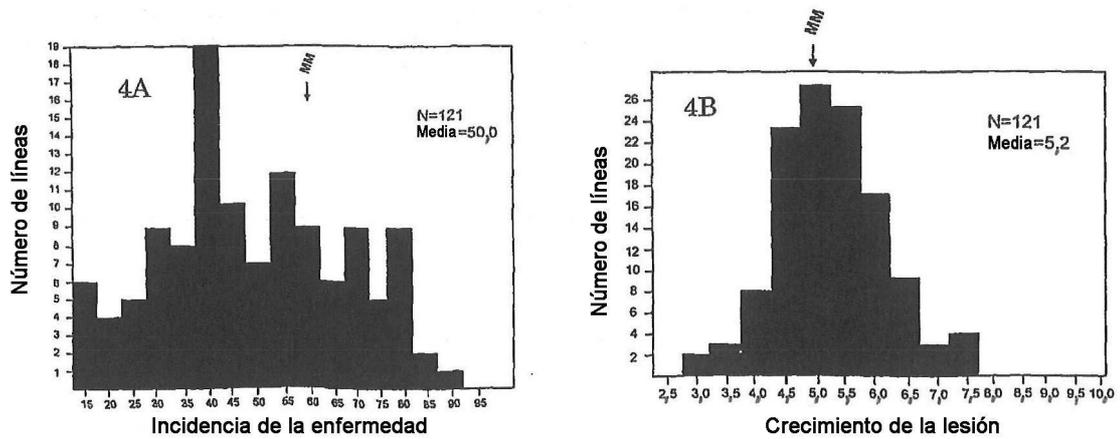


Figura 4



Cromosoma 3 Cromosoma 4 Cromosoma 9

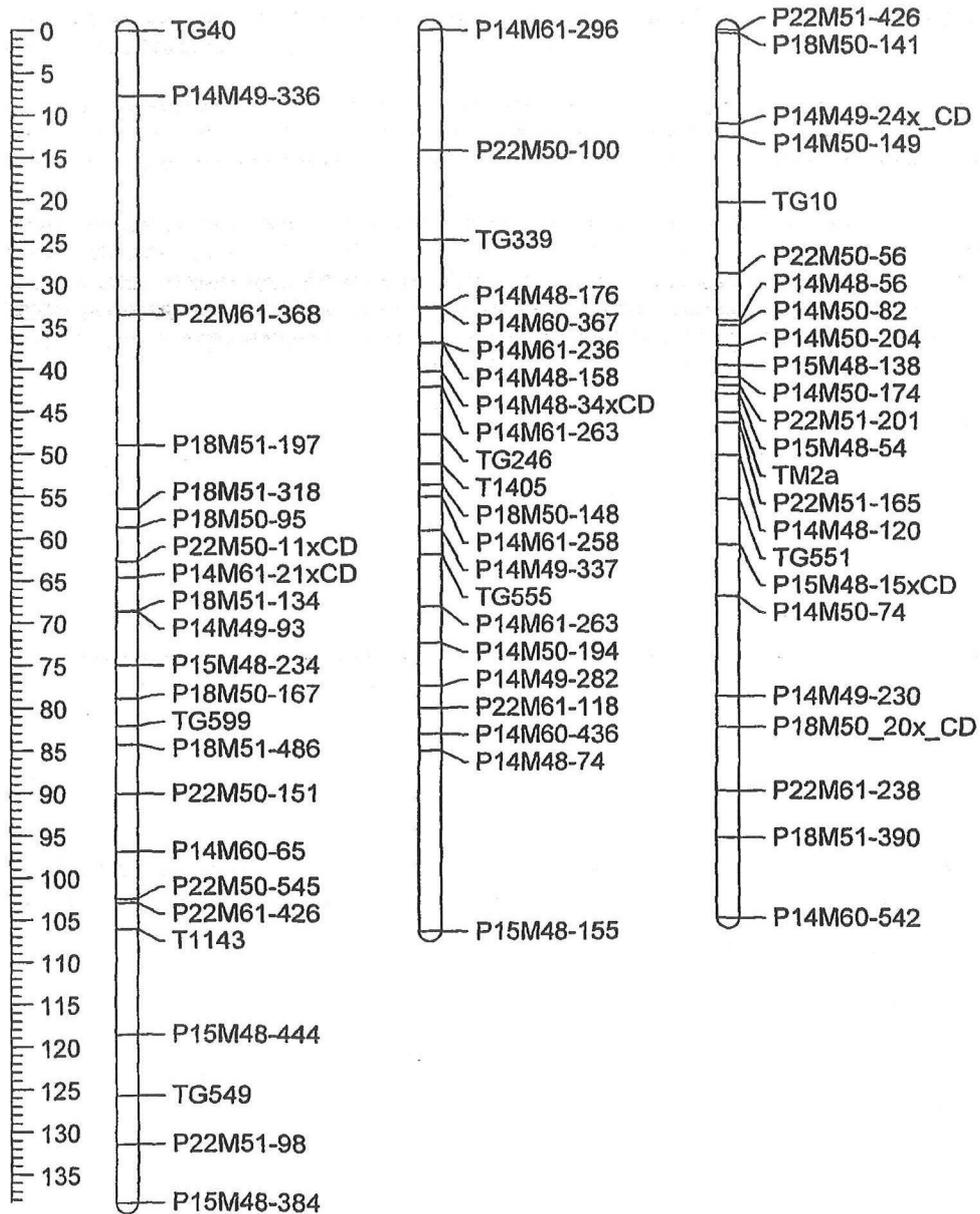


Figura 5

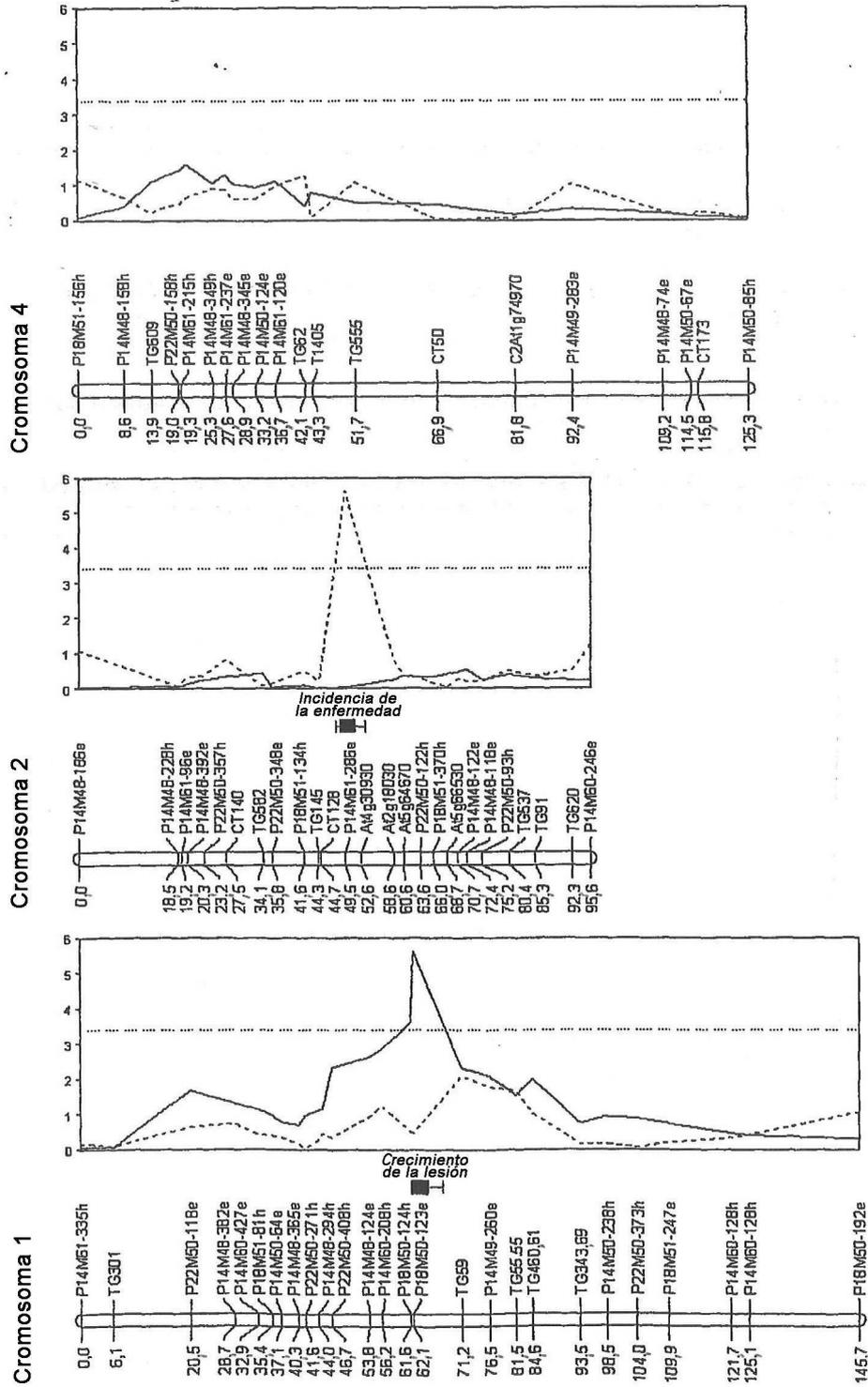


Figura 6