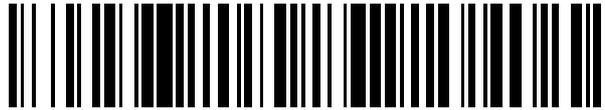


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 068**

51 Int. Cl.:

C12N 15/02 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2006 E 06822425 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 1950290**

54 Título: **Planta híbrida citoplasmática perteneciente al género Lactuca y método para la producción de la misma**

30 Prioridad:

26.10.2005 JP 2005311598

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

01.10.2015

73 Titular/es:

**SAKATA SEED CORPORATION (100.0%)
7-1, NAKAMACHIDAI 2-CHOME, TSUZUKI-KU
YOKOHAMA-SHI, KANAGAWA 2240041, JP**

72 Inventor/es:

HORIUCHI, SHINGO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

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

ES 2 547 068 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

Planta híbrida citoplasmática perteneciente al género *Lactuca* y método para la producción de la misma

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una planta híbrida del género *Lactuca* y a un método para producir la misma.

10 **Antecedentes de la técnica**

10 De manera convencional, se han generado variedades genéticamente puras y de primera generación filial (denominadas a continuación en el presente documento F1) como variedades vegetales. Entre ellas, las variedades F1 se han vuelto populares para cultivos básicos. Las variedades F1 tienen importantes ventajas, incluyendo altas tasas de crecimiento, altos rendimientos, etc., como resultado de un alto vigor de crecimiento debido a vigor híbrido (heterosis). Adicionalmente, puede esperarse que tengan mejoras en la resistencia a enfermedades e insectos plaga, y/o en la capacidad de adaptación al entorno, tal como resistencia al frío y al calor. Además, las plantas de una variedad F1 tienen el mismo genotipo, aunque sean heterocigotas, y muestran una uniformidad muy alta en sus fenotipos, aumentando la capacidad de comercialización de productos procedentes de las mismas. Además, las variedades F1 tienen una probabilidad aumentada de acumular rasgos favorables que están gobernados por un(os) gen(es) dominante(s), permitiendo su rápida reproducción. Además, proporcionan una importante ventaja de protección de los derechos del obtentor al elevar la necesidad de producir semillas F1 cada año para la producción de semillas, ya que su progenie perderá la uniformidad en cuanto a la calidad a partir de la siguiente generación como resultado de la segregación de los rasgos.

25 Las variedades F1 se han convertido en variedades cultivadas dominantes para cultivos básicos por los motivos mencionados anteriormente. Sin embargo, para la producción a gran escala de semillas F1 para propósitos comerciales, se requiere un método económico y poco laborioso para la emasculación. Para plantas que permiten la producción de muchas semillas con un único cruzamiento, incluyendo hortalizas tales como tomate, melón, pepino y calabaza, y plantas con flores tales como petunia y *Eustoma*, puede lograrse la producción económica de semillas F1 mediante emasculación y cruzamiento manuales. Sin embargo, existen todavía muchos cultivos que son muy difíciles de emasculación eficazmente por la estructuras de sus flores. Es difícil que los cultivos que producen sólo una pequeña cantidad de semillas tras un único cruzamiento produzcan semillas híbridas en grandes cantidades mediante cruzamiento manual, lo que hace que la producción de semillas F1 sea poco económica. Para la producción de semillas de tales cultivos, es crucial desarrollar un método que use la esterilidad masculina para la producción de semillas, porque puede omitirse el proceso de emasculación laborioso y caro mediante el empleo de una planta con esterilidad masculina como planta semillera parental, aprovechando por tanto las características genéticas de esterilidad masculina.

40 La esterilidad masculina se ha encontrado en muchas especies de plantas. Y se han establecido métodos para producir plantas con esterilidad masculina usando técnicas de fusión de protoplastos en muchos cultivos útiles (documentos de patente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19). Existen diversos mecanismos para la esterilidad masculina, que pueden clasificarse en dos categorías, la esterilidad masculina genética y la esterilidad masculina citoplasmática. La esterilidad masculina genética está provocada por un(os) gen(es) nuclear(es). Por otra parte, la esterilidad masculina citoplasmática implica la interacción entre un(os) factor(es) genético(s) citoplasmático(s) y un(os) gen(es) nuclear(es).

50 Se producen lechugas en todos los países del mundo. Es una hortaliza de un tamaño de mercado muy grande, y se desea enormemente la creación de sus variedades F1. Los documentos no de patente 1 y 2 describen la expresión de heterosis en la lechuga. Se investiga la expresión de heterosis comparando plantas F1 producidas mediante el uso de una lechuga con esterilidad masculina genética con variedades genéticamente puras convencionales. Como conclusión de la investigación, los investigadores notificaron que las plantas F1 presentaban heterosis destacada. Por consiguiente, se ha producido una fuerte demanda para establecer una técnica de producción de semillas usando la esterilidad masculina de la lechuga para producir semillas F1 eficazmente. Aún no se ha establecido tal técnica. Por ejemplo, aunque el documento no de patente 3 reveló el modo de herencia de la esterilidad masculina genética en la lechuga, la aplicación práctica de la esterilidad masculina genética ha seguido siendo problemática ya que es inestable en cuanto a la esterilidad masculina e incluso la fertilidad femenina parece ser defectuosa (documento no de patente 7). El autor del documento no de patente 3 también notificó resultados similares en los documentos no de patente 4 y 5. Realmente, aunque se ha puesto en el mercado una variedad F1 creada mediante el uso de esterilidad masculina genética, es inestable en cuanto a la esterilidad masculina y sigue siendo incapaz de sustituir a la variedad genéticamente pura convencional (documento no de patente 6).

65 Más recientemente, se ha encontrado un tipo novedoso de líneas con esterilidad masculina genética. Por ejemplo, se encontró la línea "MS1024" descrita en el documento de patente 1 y el documento no de patente 1 entre la progenie de plantas seleccionadas por la resistencia a enfermedades. La línea es superior a las plantas con esterilidad masculina genética descritas en el documento no de patente 3 y similares porque no produce granos de polen en absoluto en su esterilidad masculina y porque proporciona un mayor rendimiento de semillas.

Sin embargo, la producción comercial de semillas F1 usando plantas con esterilidad masculina genética todavía presenta un problema en el coste de producción. En la lechuga, la esterilidad masculina genética resulta de homocigosis para un gen recesivo en los casos observados hasta la fecha (documento no de patente 7). Debido a que las plantas con esterilidad masculina que resultaron de homocigosis para un gen recesivo no son capaces de reproducirse por sí mismas, con el fin de mantener y reproducir una línea con esterilidad masculina, es necesario cruzarlas con individuos que son heterocigotos para el gen de esterilidad masculina, y examinar su progenie para detectar los individuos que son homocigotos para el gen de esterilidad masculina. Debido a que el cruzamiento dará como resultado una segregación fenotípica 1:1 en individuos de planta fértil e individuos de planta estéril, aproximadamente el 50% de la progenie híbrida serán individuos de planta con esterilidad masculina. Por tanto, para la producción comercial de semillas F1, debe examinarse las plantas en centros de producción de semillas para encontrar y retirar los individuos de planta fértil de alguna manera. En el caso de la lechuga, este proceso de retirada es especialmente problemático porque tiene pequeños órganos florales, lo que hace difícil distinguir individuos de planta estéril e individuos de planta fértil, y produce muchas flores en pedúnculos delgados.

Además, la fase de floración es diferente para cada individuo de modo que es muy laborioso retirar individuos fértiles basándose completamente en el aspecto de las flores, y la pureza de las semillas F1 puede reducirse por errores en el proceso de retirada, lo que puede provocar un problema al reducir la calidad de las semillas.

Adicionalmente, la reproducción de plantas con esterilidad masculina genética es ineficaz y requiere un largo periodo de tiempo porque los individuos con el gen de esterilidad masculina son visualmente indistinguibles de otros excepto en la fase de floración. Para facilitar la distinción entre plantas fértiles y plantas estériles, es necesario desarrollar un método para seleccionar sólo las plantas con esterilidad masculina o bien encontrando y haciendo uso de un gen que está relacionado con la morfología de las semillas en una fase temprana de crecimiento, o bien desarrollando un marcador de ADN que esté relacionado con el gen de esterilidad masculina. Aún no se ha establecido una técnica de este tipo para la lechuga, aunque todavía hay estudios en curso para ello.

Aunque ha pasado mucho tiempo desde que se reveló el modo de herencia de la esterilidad masculina genética en la lechuga, todavía quedan por resolver muchos problemas en el desarrollo de variedades F1 usando una lechuga con esterilidad masculina genética tal como se describió anteriormente, y todavía es difícil la creación de variedades F1 con alta capacidad de comercialización.

Por otra parte, la producción de semillas F1 usando la esterilidad masculina citoplasmática ha estado en uso práctico desde hace mucho tiempo en girasol, remolacha azucarera, patata, arroz, trigo, zanahoria, cebolla y ajo, etc., y se han establecido sistemas de producción comercial para esos cultivos. También en cultivos de col tales como repollo, brócoli, rábano y repollo chino, en los se ha usado ampliamente la producción de semillas F1 usando autoincompatibilidad, el uso de la esterilidad masculina citoplasmática para la producción de semillas F1 se ha vuelto popular recientemente debido a la demanda de semillas de mayor calidad.

En general, una vez que se produce una planta con esterilidad masculina citoplasmática con esterilidad masculina estable, puede introducirse esterilidad masculina citoplasmática en muchas líneas deseables mediante retrocruzamiento repetido y se vuelve posible la reproducción de plantas semilleras parentales para obtener variedades F1. Debido a que la esterilidad masculina citoplasmática se transmite mediante herencia citoplasmática, toda la progenie tendrá esterilidad masculina. Las líneas con esterilidad masculina citoplasmática pueden mantenerse y hacerse proliferar fácilmente mediante cruzamiento con una línea de mantenimiento que tiene el mismo genoma nuclear y citoplasma normal. Puesto que no hay necesidad de retirar individuos fértiles de plantas semilleras parentales en centros de producción de semillas como en la producción de semillas usando la esterilidad masculina genética mencionada anteriormente, la producción de semillas usando la esterilidad masculina citoplasmática es eficaz, y sin el problema de la disminución de la pureza de semillas F1 debido a errores en el proceso de retirada.

Basándose en estos hechos, se espera que un método para la producción de semillas F1 usando una planta con esterilidad masculina citoplasmática sea mucho más útil en un sentido económico y comercial en comparación con los que usan la esterilidad masculina genética.

A pesar de las expectativas de que un método de ese tipo sería enormemente útil tal como se describió anteriormente, no se ha desarrollado aún un método para la producción de semillas F1 usando una planta con esterilidad masculina citoplasmática en la lechuga. Esto es debido a que, para la lechuga, no hay una planta que pueda cruzarse de la misma especie o género que tenga un citoplasma con la capacidad para producir esterilidad masculina citoplasmática cuando se introduce en el citoplasma de la lechuga.

Por otra parte, para especies cultivadas de girasol (*Helianthus annuus* L.) del género *Helianthus* de la familia Asteraceae, se han encontrado muchas plantas con esterilidad masculina citoplasmática procedentes de la hibridación interespecífica y están en uso práctico variedades F1. Los documentos no de patente 9-13 y otros documentos han informado de éstas. Como ejemplo de la producción de una hortaliza con esterilidad masculina citoplasmática en la familia *Asteraceae*, se sabe que puede producirse achicoria con esterilidad masculina

citoplasmática mediante la fusión de protoplastos de girasol y achicoria. Tales técnicas se divulgan, por ejemplo, en los documentos de patente 2 y 3 y los documentos no de patente 14 a 17.

5 El documento no de patente 14 fue el primer informe de la producción de achicoria con esterilidad masculina citoplasmática, y reveló que puede producirse achicoria con esterilidad masculina citoplasmática mediante la introducción del citoplasma de girasol en achicoria usando la técnica de fusión de protoplastos. El documento no de patentes 14 también informó de que el genoma mitocondrial en la achicoria con esterilidad masculina citoplasmática producida resultaba de la recombinación de los genomas mitocondriales de la achicoria y el girasol. Además, los documentos no de patente 16 y 17 informaron sobre los resultados de los análisis de la expresión de la esterilidad masculina citoplasmática y de la estructura del ADN mitocondrial en la progenie de la achicoria con esterilidad masculina citoplasmática mencionada anteriormente.

15 El documento de patente 2 describe una planta con esterilidad masculina citoplasmática de la familia Asteraceae y un método para obtener una planta de este tipo. La única planta con esterilidad masculina citoplasmática que se mostró que se producía realmente en el documento de patente 2 es achicoria con esterilidad masculina citoplasmática como en el documento no de patente 14. Aunque el documento de patente 2 se refiere a lechuga con esterilidad masculina citoplasmática, sólo establece métodos para cultivar y fusionar protoplastos con frases en tiempo presente y no se ha descrito ningún método ni resultado de experimento de la producción real de lechugas híbridas o lechugas con esterilidad masculina citoplasmática. En la técnica de fusión de protoplastos, el procedimiento es relativamente fácil hasta la etapa de aislamiento y fusión de los protoplastos. Por ejemplo, incluso es posible aislar y fusionar protoplastos vegetales y células animales. Sin embargo, las etapas de cultivo de las células fusionadas entre especies filogenéticamente distantes para que se dividan, y además se regenere una planta son muy difíciles técnicamente. Esto se debe al aumento de las dificultades técnicas debido al estrés durante el proceso de fusión, que puede suprimir la división celular de las células fusionadas, y la incompatibilidad genética entre los núcleos y el citoplasma de orígenes heterólogos. Para superar estas dificultades para regenerar una planta, es necesario desarrollar un método para fusionar células sin dañar su membrana celular, y un método de cultivo que permita que las células fusionadas con nuevas combinaciones genómicas se dividan y regeneren para dar una planta. Por tanto, las técnicas de cultivo de células fusionadas y posteriormente de regeneración de una planta a partir de las células fusionadas son las técnicas fundamentales de la técnica de fusión de protoplastos. Además, para tener la expresión de la esterilidad masculina, es necesario que se produzca la recombinación o redistribución de los genomas mitocondriales entre diferentes especies en una distancia filogenética adecuada. Por tanto, incluso tras volverse posible producir una planta híbrida a partir de dos especies relacionadas de manera distante, no es predecible si será posible producir una planta que exprese la esterilidad masculina, y por tanto, es esencial la etapa de producir realmente plantas híbridas y seleccionar un individuo que presente esterilidad masculina. Por tanto, no se divulgan técnicas cruciales para producir lechugas con esterilidad masculina citoplasmática en el documento de patente 2. Por estos motivos, incluso después del documento de patente 2 no hay informes de la producción satisfactoria de lechugas con esterilidad masculina citoplasmática a pesar de que existe una fuerte demanda de desarrollar un método para producir lechugas con esterilidad masculina citoplasmática desde hace mucho tiempo.

40 El documento de patente 3 divulga un método de producción de achicoria con esterilidad masculina citoplasmática mediante la introducción de orf522, un gen que se cree que es un gen causante de esterilidad masculina citoplasmática en girasol, en una planta del género *Cichorium* mediante fusión asimétrica de protoplastos.

45 El documento no de patente 15 describe la producción de achicoria con esterilidad masculina citoplasmática por un nuevo grupo de investigación, que, en los últimos años ha estado realizando estudios para producir achicoria con esterilidad masculina citoplasmática adecuada para uso práctico, continuando el trabajo.

50 Tal como se describió anteriormente, existen muchos informes de la producción de achicoria con esterilidad masculina citoplasmática mediante la introducción de una parte de ADN mitocondrial de girasol mediante fusión de protoplastos. Sin embargo, no existen informes de la producción de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática a pesar de que la lechuga y la achicoria son ambas de la familia Asteraceae. La dificultad de producción de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática usando girasol con esterilidad masculina citoplasmática puede deberse a la baja compatibilidad genética entre el genoma nuclear de la lechuga y el genoma mitocondrial del girasol, en comparación con la compatibilidad genética entre el genoma nuclear de la achicoria y el genoma mitocondrial del girasol.

55 Además, puede considerarse introducir esterilidad masculina citoplasmática en la lechuga cruzándola con achicoria con esterilidad masculina citoplasmática que se produce mediante la introducción del gen de esterilidad masculina citoplasmática de girasol en achicoria. Sin embargo, la hibridación sexual entre lechuga y achicoria es difícil porque son de diferentes géneros y están relacionadas de manera distante. No existen informes conocidos de la producción satisfactoria de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática usando un método de este tipo.

60 Tal como se describió anteriormente, la producción de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática es muy difícil técnicamente, y no ha sido satisfactoria aún. Sin embargo la creación de variedades F1 de lechuga usando lechuga con esterilidad masculina citoplasmática será muy beneficiosa. Por tanto, se ha deseado enormemente la creación de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática.

Documento de patente 1 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2005-110623

Documento de patente 2 Patente europea n.º 0771523

Documento de patente 3 Publicación internacional n.º WO97/45548

Documento de patente 4 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 62-232324

Documento de patente 5 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 63-79548

Documento de patente 6 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 02-303426

Documento de patente 7 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 63-36776

Documento de patente 8 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 64-20041

Documento de patente 9 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 01-218530

Documento de patente 10 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 10-052185

Documento de patente 11 patente estadounidense n.º 5254802

Documento de patente 12 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 10-108676

Documento de patente 13 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 10-108677

Documento de patente 14 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2001-145497

Documento de patente 15 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 02-138927

Documento de patente 16 Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 01-206931

Documento de patente 17 Publicación internacional n.º WO99/55143

Documento de patente 18 Publicación internacional n.º WO95/09910

Documento de patente 19 Publicación internacional n.º WO97/09873

Documento de patente 20 Patente n.º 3635036

Documento no de patente 1 Takada, Katuya y Fujino, Masatake (1987) "Estudio sobre la producción de semillas F1 en la lechuga (1): Heterosis de plantas F1 usando líneas con esterilidad masculina como plantas semilleras parentales (en japonés) " 1987 Spring Conference of Japanese Society for Horticultural Science, Research Abstract 208-209.

Documento no de patente 2 Takada, Katuya y Fujino, Masatake (1986) "Desarrollo de técnicas usando la esterilidad masculina en la lechuga (1): Expresión de heterosis en híbridos F1 (en japonés) "National Institute of Vegetable and Tea Science, Morioka Research Station, Annual Research Report No. 1, 87-93.

Documento no de patente 3 Edwrd J. Ryder (1967) A recessive male sterility gene in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Pro. Am. Soc. Hortic. Sci. 91, 366-368.

Documento no de patente 4 Ryder, E, J Proceeding of the American Society for horticultural Science 1963 vol. 83 585-589 An epistatically controlled pollen sterile in Lettuce (*Lactuca sativa* L).

Documento no de patente 5 Ryder, E, J Science 1989 vol. 114(1) 129-133 Studies of three new genes, linkage, and epistasis in Lettuce.

Documento no de patente 6 Solicitud de registro de variedad "Fine" (en japonés), Kaneko Seeds, n.º 1745.

Documento no de patente 7 Serizawa, Hiroaki, "Gen recesivo de esterilidad masculina en la lechuga (en japonés) "Journal of Japanese Society for Horticultural Science, vol. 73, supl. 2, pág. 566.

Documento no de patente 8 Matsumoto, E., Plant cell reports 1991. Vol. 9(10) Interspecific somatic hybridization between lettuces (*Lactuca sativa*) and wild species *L. virosa*

Documento no de patente 9 L. H. Rieseberg, C. Van Fossen, D. Arias, y R. L. Carter, The Journal of heredity 1994: 85 (3), 233-238 Cytoplasmic male sterility in Sunflower: origin, Inheritance, and Frequency in Natural Populations.

Documento no de patente 10 R. Horn Theor Appl Genet (2002) 104: 562-570 Molecular diversity of male sterility inducing and male-fertile cytoplasms in the genus *Helianthus*.

Documento no de patente 11 S. Sukno, J. Ruso, Euphytica (1999) 106: 69-78 Interspecific hybridization between sunflower and wild perennial *Helianthus* species via embryo rescue.

Documento no de patente 12 R. Horn, W. Friedt, Plant Breeding 116 (1997) 317-322 Fertility restoration of new CMS sources in sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Documento no de patente 13 Horn, R., Plant molecular biology; an international journal on fundamental research and genetic engineering, julio de 1991 v17(1), 29-36 A mitochondrial 16kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower.

Documento no de patente 14 C. Rambaud, J. Dubois, J. Vasseur (1993) Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion, Theor Appl Genet 87: 347-352

Documento no de patente 15 S. Varotto, E. Nenz, M. Lucchin, P. Parrini (2001) Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L., Theor Appl Genet 102: 950-956.

Documento no de patente 16 C. Rambaud, A. Bellamy, A. Dubreucq, J.-C. Bourquin y J. Vasseur (1997) Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from a cytoplasmic male sterile chicory cybrid, Plant Breeding 116: 481-486

Documento no de patente 17 A. Dubreucq, Theor Appl Genet (1999): 1094-1105 Analyses of mitochondrial DNA structure and expression in three cytoplasmic male-sterile chicories originating from somatic hybridisation between fertile chicory and CMS sunflower protoplasts.

Documento no de patente 18 Mizutani, Takayuki (1989) "Regeneración de plantas y fusión de protoplastos usando protoplastos de lechuga y especies silvestres japonesas relacionadas (en japonés)" Bull. Fac. Agr., Saga Univ 67: 109-118.

Divulgación de la invención

5 En vista de los problemas anteriores en la técnica convencional, la presente invención tiene como objeto proporcionar una lechuga cíbrida del género *Lactuca* que es útil para la producción de semillas F1 de lechuga, y un método para producir la misma.

10 Los presentes inventores han estudiado de manera diligente cómo solucionar los problemas anteriores y encontraron que puede producirse una lechuga con esterilidad masculina citoplasmática estable mediante el uso de un método para cultivar células híbridas fusionadas entre girasol y lechuga, y un método para regenerar una planta cíbrida, y que pueden producirse eficazmente semillas F1 de lechuga mediante el uso de esta lechuga con esterilidad masculina citoplasmática, completando de ese modo la presente invención.

15 Por tanto, la presente invención engloba las invenciones, tal como se describe en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 es una fotografía de electroforesis que muestra el resultado de PCR usando los cebadores específicos para los genes mitocondriales de girasol orf522 (parte superior) y orf873 (parte inferior) y ADN extraído de 2 líneas de girasol con esterilidad masculina citoplasmática, 1 línea de girasol con fertilidad masculina y 13 variedades cultivadas de lechuga como materiales de prueba;

25 la figura 2 es una fotografía de electroforesis que muestra un resultado a modo de ejemplo de las pruebas de las plantas cíbridas usando los cebadores específicos para los genes mitocondriales de girasol orf522 y orf873;

30 la figura 3 es una fotografía de electroforesis que muestra el patrón de PCR-RFLP, en el que se extrajo ADN de 2 líneas de girasol con esterilidad masculina citoplasmática, 1 línea de girasol con fertilidad masculina y 13 variedades cultivadas de lechuga como materiales de prueba, se realizó PCR usando los moldes de ADN y los cebadores específicos para el gen cloroplástico *rbcl*, y se cortaron con TaqI los productos amplificados;

la figura 4 muestra la morfología floral de la variedad de lechuga cultivada "Tell me" (A: inflorescencia, B: capítulo floral, C: centro del capítulo floral (aumento x 20) y D: pistilo y tubo de anteras (aumento x 64));

5 la figura 5 muestra la morfología floral de una lechuga con esterilidad masculina citoplasmática (A: inflorescencia, B: capítulo floral, C: centro del capítulo floral (aumento x 20) y D: pistilo con polen adherido al mismo y tubo de anteras (aumento x 64));

la figura 6 muestra una observación de los cromosomas de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática;

10 la figura 7 muestra que la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática puede producir las semillas de progenie cuando se cruza con polen de una lechuga con fertilidad masculina;

15 la figura 8 es una fotografía de electroforesis que muestra el resultado de PCR con los cebadores específicos para el gen mitocondrial de girasol orf873, para someter a prueba ADN extraído de hojas de los 14 individuos en la generación BC3 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática;

20 la figura 9A es una fotografía de electroforesis que muestra el resultado de PCR con los cebadores específicos para los genes mitocondriales atp6, cox II y cob para someter a prueba ADN extraído de hojas de los 14 individuos en la generación BC3 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática. Para los genes mitocondriales atp6, cox II y cob el resultado mostrado es el de PCR-RFLP en el que los productos de amplificación por PCR se digirieron adicionalmente con una(s) enzima(s) de restricción;

25 la figura 9B es una fotografía de electroforesis que muestra el resultado de PCR con los cebadores específicos para los genes mitocondriales rps3, trnN, trnY, trnS y trnP, para someter a prueba ADN extraído de hojas de los 14 individuos en la generación BC3 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática;

30 la figura 10 es una fotografía de electroforesis que muestra el patrón de PCR-RFLP, en el que se extrajo ADN de 14 individuos en la generación BC3 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática, se realizó PCR usando los moldes de ADN y los cebadores específicos para el gen cloroplástico rbcl, y se cortaron con TaqI los productos de amplificación por PCR;

la figura 11 muestra la morfología de los pistilos y los órganos florales de una planta F1 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática "12 16-2-T1" X "Tell me";

35 la figura 12 muestra la morfología de los pistilos y los órganos florales de una planta F1 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática "12 16-2-T1" X "Steady";

40 la figura 13 muestra la morfología de los pistilos y los órganos florales de una planta F1 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática "12 16-2-T1" X "Logic";

la figura 14 muestra la morfología de los pistilos y los órganos florales de una planta F1 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática "12 16-2-T1" X "Miya"; y

45 la figura 15 muestra la morfología de la planta, los pistilos y los órganos florales de una planta F1 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática "12 16-2-T1" X la especie silvestre de lechuga *L. serriola*.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

50 Una célula híbrida fusionada y una planta cíbrida según la presente invención pueden producirse mediante el método que comprende las siguientes etapas:

(1) preparación de protoplastos;

55 (2) tratamiento de fusión de protoplastos;

(3) cultivo de células híbridas fusionadas;

(4) regeneración de plantas a partir de microcallos;

60 (5) selección de plantas cíbridas;

(6) selección de líneas favorables;

65 (7) uso de plantas con esterilidad masculina citoplasmática y la producción de semillas F1.

Los detalles de cada etapa son de la siguiente manera.

(1) Preparación de protoplastos(i) Aislamiento de protoplastos de una planta del género *Lactuca*

Preferiblemente, la planta del género *Lactuca* para la preparación de protoplastos es *Lactuca sativa* L., *L. serriola*, *L. aculeate*, *L. scarioloides*, *L. azerbaijanica*, *L. georgica*, *L. dregeana*, *L. altaica*, *L. saligna*, *L. virosa*, *L. tatarica*, *L. indica* o *L. debilis*, o una planta híbrida interespecifica de las mismas, y particularmente *L. sativa* L., que es una especie cultivada de lechuga. *L. sativa* L. se clasifica en var. angustana (incluyendo espárrago lechuga, lechuga china, etc.), var. longifolia (incluyendo de tipo cos, lechuga romana, etc.), var. crispa (incluyendo lechuga de hoja, lechuga rizada, etc.), var. capitata (lechuga de cogollos, lechuga trocadero, lechuga de cabeza, lechuga arrepollada, etc.) y similares, y éstas son todas las variedades en la misma especie diferenciadas por diferencias ecológicas. En la presente invención, cualquier variedad de *L. sativa* L. puede usarse de manera adecuada. Aunque la endivia, la achicoria, etc. tienen características similares a la lechuga, no están incluidas en la lechuga porque no son del género *Lactuca* ("Enciclopedia de Horticultura vegetal 7: Lechuga y Apio (en japonés) "1ª ed., pág. 87, Rural Culture Association, publicado el 30 de abril de 1989).

El tejido celular usado para obtener protoplastos es de manera deseada tejido mesófilo, que proporciona alto rendimiento y es sumamente activo en la división celular, pero puede usarse como material otro tejido tal como hipocótilo, tallo y callo.

El método para aislar protoplastos no se limita a un método particular, sino que puede ser uno que se use comúnmente (documentos no de patente 8 y 18). En primer lugar, un tejido celular de lechuga se corta en trozos finos, y se trata con una(s) enzima(s) para aislar los protoplastos. En este caso, se usa una disolución enzimática para el aislamiento de protoplastos. Esta disolución es un tampón de sal inorgánica que contiene principalmente una(s) enzima(s) de digestión de pared celular y un agente osmótico. Esta enzima de digestión de pared celular no se limita a enzimas particulares, sino que puede ser cualquier enzima que pueda usarse para digerir una pared celular vegetal, incluyendo celulasa, hemicelulasa, pectinasa, etc. En la presente invención, se usa preferiblemente la combinación de Meicelase y Maserozyme R-10. Un agente osmótico puede ser un alcohol de azúcar habitual, por ejemplo, manitol, sorbitol, glucosa etc., y es preferiblemente manitol, y más preferiblemente manitol a de 0,3 a 0,7 M de concentración. Además, se añaden de manera deseada sales inorgánicas a la disolución enzimática para estabilizar la membrana de los protoplastos. Por ejemplo, se prefiere la adición de disolución de sales CPW (Cocking y Peberdy, 1974), cuya composición se muestra en la tabla 1. Preferiblemente, el tratamiento enzimático se realiza a de 25 a 30°C durante de 8 a 20 horas sin movimiento.

Tabla 1

Composición de la disolución de sales CPW

KH ₂ PO ₄	27,2 mg/l
KNO ₃	101,0 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,480,0 mg/l
MgSO ₄	246,0 mg/l
KI	0,16 mg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025 mg/l
Manitol	0,6 M
pH	5,8

Los protoplastos aislados mediante el tratamiento enzimático se filtran a través de malla de nailon con el tamaño de poro de 30 a 100 µm, se centrifugan y se recogen para retirar la disolución enzimática. Entonces, los protoplastos se suspenden en una disolución de lavado, y se lavaron. Aunque la disolución de lavado puede ser una disolución de sales CPW con alcohol de azúcar añadido como agente osmótico tal como se usa comúnmente, en este ejemplo se usa preferiblemente la disolución S, cuya composición se muestra en la tabla 2, como disolución de lavado porque la disolución S se usa de manera deseada cuando los protoplastos se fusionan con protoplastos derivados de una planta del género *Helianthus*, que se aíslan después (como referencia, véase Lenée P, Chupeau Y (1986) Plant Sci. 43: 69-75).

Tabla 2

Composición de la disolución S

CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.000 mg/l
KCl	250.000 mg/l
MES	700 mg/l
pH	5,6

Entonces, se realiza de manera deseada un tratamiento de inactivación para impedir la división celular de los protoplastos de la planta del género *Lactuca*. El tratamiento de inactivación puede llevarse a cabo mediante la suspensión de los protoplastos en una disolución de sales CPW, etc. que contiene compuestos de yodo tales como ácido yodoacético y yodoacetamida. En la presente invención, el tratamiento de inactivación se lleva a cabo preferiblemente mediante la suspensión de los protoplastos en una disolución CPW que contiene yodoacetamida a de 5 a 30 mM de concentración, e incubación durante de 5 a 20 minutos.

Entonces, los protoplastos se lavan preferiblemente con la disolución S de 1 a 3 veces mediante centrifugación. Los protoplastos se purifican adicionalmente mediante centrifugación en gradiente de densidad, etc., porque fragmentos de recipientes y células contaminan la suspensión de protoplastos. Puede usarse azúcar, coloide sintético, etc., como reactivo en la purificación. En la presente invención, se usa preferiblemente una disolución de sacarosa, y más preferiblemente se usa una disolución de sacarosa a del 15 al 20%. Tras la purificación de los protoplastos, se mide la densidad celular con un hemocitómetro, y el volumen de la suspensión se ajusta con la disolución S para que tenga una densidad celular adecuada para la fusión de protoplastos. Las densidades celulares preferidas de la suspensión de protoplastos son de 1×10^5 a 1×10^7 células/ml, y la disolución S se usa preferiblemente para ajustar el volumen.

(ii) Aislamiento de protoplastos de una planta del género *Helianthus*

Puede usarse una planta del género *Helianthus* como material donador para proporcionar el citoplasma en la presente invención. En el género *Helianthus*, se prefiere particularmente *Helianthus annuus* L., que es una variedad cultivada de girasol, o una línea de sustitución citoplasmática de *H. annuus* L. con citoplasma de *H. petiolaris*, *H. argophyllus*, *H. debilis*, *H. decapetalus*, *H. giganteus*, *H. rigidus*, *H. salicifolius*, *H. anomalus*, *H. bolanderi*, *H. exilis*, *H. maximiliani*, *H. neglectus*, *H. praecox* o *H. tuberosus*.

La planta del género *Helianthus* usada en la presente invención es una línea con esterilidad masculina citoplasmática.

De manera convencional, se han producido muchas líneas con esterilidad masculina citoplasmática en *H. annuus* L. Se sabe que se derivan de mutaciones naturales o la progenie de diversas hibridaciones interespecíficas en especies cultivadas. En particular, se conocen líneas con esterilidad masculina citoplasmática derivadas de mutantes naturales de *H. annuus* L., o diversas líneas de sustitución citoplasmática de *H. annuus* L., y se ha mostrado su divergencia usando técnicas de biología molecular (documento no de patente 10). Por tanto, ya se han obtenido muchas líneas de sustitución citoplasmática que presentan esterilidad masculina citoplasmática. En la presente invención, diversas líneas de sustitución citoplasmática del género *Helianthus* pueden usarse como material donador para proporcionar el citoplasma.

Para obtener una planta cibrida del género *Lactuca* con esterilidad masculina citoplasmática según la presente invención, se usan plantas del género *Helianthus* que tienen un gen de esterilidad masculina citoplasmática como material donador para proporcionar el citoplasma. Cuando se fusionan protoplastos de una planta del género *Helianthus* y protoplastos de una planta del género *Lactuca*, las líneas que expresan esterilidad masculina citoplasmática pueden obtenerse como resultado de la recombinación o redistribución entre los genomas mitocondriales de esas plantas. Las plantas híbridas resultantes del género *Lactuca* que tienen esterilidad masculina citoplasmática también están englobadas por la presente invención.

La inactivación del genoma nuclear también puede realizarse mediante irradiación a las células de las plantas del género *Helianthus* que se usan en la fusión de protoplastos. Como resultado de la inactivación del genoma nuclear en las células del género *Helianthus*, la regeneración tras la fusión de células del género *Helianthus* y el género *Lactuca* se produce sin ninguna influencia del genoma nuclear en la planta del género *Helianthus*, pero con la capacidad de rediferenciación del genoma nuclear del género *Lactuca*, se hace posible la regeneración de una planta del género *Lactuca* que tiene los genes citoplasmáticos de la planta del género *Helianthus*.

En la presente invención, diversas plantas materiales del género *Helianthus* pueden elegirse como células donadoras para proporcionar el citoplasma, tal como se describió anteriormente, y es posible producir plantas cbridas del género *Lactuca* con diversos contextos genéticos.

Para preparar protoplastos de una planta del género *Helianthus*, en primer lugar se corta un tejido celular de la planta del género *Helianthus* en trozos finos, y se empapan con una disolución enzimática para el aislamiento de protoplastos, para aislar los protoplastos. El tejido celular que va a usarse es preferiblemente hipocótilo, debido al alto rendimiento y la robustez de la membrana celular, pero pueden usarse otros tejidos tales como hoja y tallo como

material. Las enzimas de digestión de pared celular no se limitan a enzimas particulares, sino que puede ser cualquier enzima que pueda usarse para digerir una pared celular vegetal; se usa preferiblemente la combinación de Driserase y Maserozyme R-10 en la presente invención. Además, las enzimas de digestión de pared celular se usan preferiblemente en una disolución cuya presión osmótica se ajusta con sales inorgánicas tales como KCl y NaCl, porque los protoplastos aislados de hipocótilo en la planta del género *Helianthus* tienen bajas densidades relativas. Por ejemplo, se usa preferiblemente la disolución S en la presente invención. Preferiblemente, el tratamiento enzimático se realiza a de 25 a 30°C durante de 8 a 20 horas sin movimiento. Los protoplastos aislados mediante el tratamiento enzimático se filtran a través de malla de nailon con el tamaño de poro de 30 a 100 µm. Debido a que no se requieren los genes nucleares en los protoplastos derivados de la planta del género *Helianthus*, los genes nucleares en los protoplastos aislados se inactivan de manera deseada mediante irradiación. La irradiación no se limita a una clase particular, sino que puede ser de cualquier clase que pueda inactivar genes nucleares, incluyendo rayos X, rayos gamma y ultravioleta, etc. Preferiblemente, la cantidad de irradiación es la menor en el intervalo que es suficiente para inactivar los núcleos. Por ejemplo, las cantidades preferidas de irradiación son de 0,1 a 0,6 Gy de rayos X blandos en la presente invención.

(2) Tratamiento de fusión de protoplastos

Entonces, se fusionan los protoplastos de las dos clases que recibieron el tratamiento de inactivación tal como se describió anteriormente. El método de fusión no se limita a métodos particulares, sino que puede ser uno de los métodos conocidos de manera pública incluyendo electrofusión (Plant, 151, 26-32, 1981), método con PEG (Plant, 120, 215-227, 1974) y método con dextrano (Jap. J. Genet., 50, 235, 1975), etc. En la presente invención, se usa preferiblemente un método con PEG modificado.

(3) Cultivo de células híbridas fusionadas

Se cultivan preferiblemente las células que recibieron el tratamiento de fusión en un medio adecuado para cultivar protoplastos de una planta del género *Lactuca*. Se conocen muchos métodos para cultivar protoplastos de una planta del género *Lactuca*, y puede usarse adecuadamente cualquier método en la presente invención. En particular, se usa preferiblemente un método modificado de un método conocido de manera pública (Nishio, T., *et al.*, Japanese Journal of Breeding, 38, 165-171) en la presente invención. El método de Nishio *et al.* es un excelente método que es eficaz para cultivar protoplastos de plantas del género *Lactuca*. Sin embargo, este método de Nishio *et al.* no es aplicable a la presente invención sin ninguna modificación. Nishio *et al.* notificaron el cultivo de protoplastos de una única planta del género *Lactuca*, y esos protoplastos no recibieron ningún tratamiento de fusión y, por tanto, tenían un pequeño daño en su membrana celular. Esto hizo posible cultivar esos protoplastos sobre un medio sólido que contenía goma gelán desde el comienzo del cultivo. En la presente invención, la membrana celular de células que van a cultivarse tras el tratamiento de fusión es frágil debido al estrés del tratamiento. Por tanto, es difícil cultivar células fusionadas eficazmente en el método de Nishio *et al.*, porque esas células se rompen cuando se mezclan con goma gelán. Por consiguiente, se cultivan las células tras el tratamiento de fusión en primer lugar en un medio líquido que no contiene goma gelán para facilitar la restauración de la membrana celular antes de añadir goma gelán al medio tras de 3 a 7 días de cultivo. Esta modificación del método de Nishio *et al.* permite el cultivo eficaz de células fusionadas. Las células fusionadas se hacen pasar de manera adecuada a un nuevo medio con presión osmótica disminuida porque forman microcallos a través de divisiones celulares repetidas.

(4) Regeneración de plantas a partir de microcallos

Cuando los microcallos han crecido hasta varios milímetros de tamaño, se transfieren a medio de rediferenciación y se permite que se regeneren. Las respuestas al medio de rediferenciación pueden diferir dependiendo de la planta material del género *Lactuca* y el estado de los microcallos. Por ejemplo, es adecuado usar medio MS (Murasige, T. & Skoog, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497 (1962)) que contiene de 0,3 a 1,0 mg/l de BA o un medio similar. Los brotes regenerados se transfieren a un medio de enraizado, por ejemplo medio MS de 1/2 de concentración, que permite que se regeneren para dar una planta. Las plantas regeneradas se plantan en un invernadero tras la aclimatación.

(5) Selección de planta cíbrida

Se extrae ADN de hojas de las plantas regeneradas según el procedimiento descrito anteriormente, y las plantas del género *Helianthus* y el género *Lactuca* se usan como plantas materiales. Por ejemplo, pueden distinguirse plantas cíbridas en las que se introducen los genes mitocondriales de *H. annuus* L. mediante el uso de PCR para detectar los genes mitocondriales específicos para *H. annuus* L., tales como orf522, orf708 u orf873 como marcador. En primer lugar, se diseñan cebadores que amplifican específicamente el gen diana para realizar la PCR. Entonces, se realiza electroforesis para confirmar el tamaño de banda esperado. De esta manera, pueden seleccionarse los individuos con una planta del género *Lactuca* y el ADN mitocondrial de una planta del género *Helianthus* introducido en la planta. Además, puede usarse PCR-RFLP (Tsumura, Y., Yoshimura, K. Tomaru, N. *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 91, 1222-1236, 1995) para detectar el ADN mitocondrial de la planta del género *Helianthus* distinguiéndolo del ADN mitocondrial de la planta del género *Lactuca*.

De manera deseada, también se usa PCR-RFLP para confirmar que los cloroplastos de las plantas cíbridas

seleccionadas mediante el análisis de PCR se derivan de la planta del género *Lactuca*. Los genes cloroplásticos que pueden usarse para PCR-RFLP no se limitan a genes particulares, sino que pueden ser cualquier gen que pueda usarse para detectar el polimorfismo entre plantas del género *Helianthus* y el género *Lactuca*, incluyendo *rbcl*, *matK*, etc. Se diseñan cebadores que amplifican específicamente la región de gen cloroplástico diana para realizar la PCR. El producto amplificado de PCR se trata con una(s) enzima(s) de restricción, y se detecta RFLP debido a las diferencias de los sitios de enzima de restricción para confirmar el origen de los cloroplastos. Los individuos con los cloroplastos de la planta del género *Lactuca* se seleccionan de manera deseada en vista de la compatibilidad con los genes nucleares.

La confirmación del ADN tal como se describió anteriormente puede realizarse cuando son callos así como tras la aclimatación de las plantas. Además, es deseable evaluar la ploidía mediante citometría de flujo o mediante la observación de los cromosomas.

(6) Selección de líneas favorables

Las plantas híbridas resultantes se examinan para detectar líneas con esterilidad masculina sin anomalías morfológicas en otros órganos. Es especialmente importante seleccionar las líneas con mayor fertilidad femenina, ya que la fertilidad femenina, es decir la producción de semillas, tiende a disminuir, cuando hay un defecto en un órgano genital, tal como esterilidad masculina. Puede lograrse una selección eficaz mediante el análisis del genoma mitocondrial de plantas híbridas mediante análisis por PCR-RFLP, etc. y usando los datos para la selección. Por ejemplo, cuando algunos de los genes mitocondriales de la planta del género *Helianthus* se introducen en un individuo, de modo que se expresa esterilidad masculina en el individuo, aunque muchos genes mitocondriales en el individuo son todavía iguales a los de la planta del género *Lactuca*, el individuo tiene mayor compatibilidad con el núcleo de la planta del género *Lactuca*, y por tanto, existe una mayor probabilidad de que los rasgos distintos a la esterilidad masculina sean normales.

Además, los individuos con esterilidad masculina seleccionados se cruzan con polen de la lechuga con citoplasma normal para confirmar que la esterilidad masculina se transmite a la progenie híbrida mediante herencia citoplasmática. Además, muchas progenies híbridas se hacen crecer en diversos entornos para confirmar que la esterilidad masculina es estable.

Con el fin de mejorar las posibilidades de seleccionar líneas favorables, es eficaz una técnica de aumento del número de las plantas híbridas del género *Lactuca*, que son candidatos para la selección. Además, una técnica de seleccionar principalmente líneas de plantas favorables que tienen esterilidad masculina citoplasmática de un número relativamente pequeño de las plantas híbridas del género *Lactuca* como candidatos y entonces mejorar adicionalmente el citoplasma de las líneas de plantas favorables seleccionadas también es eficaz para obtener líneas favorables deseadas. Cualquiera de las dos técnicas anteriores puede seleccionar líneas favorables. Además, puede emplearse una combinación de ambas técnicas. Un método preferido de mejora adicional del citoplasma de una planta híbrida con esterilidad masculina citoplasmática del género *Lactuca* es, por ejemplo, el uso de una planta híbrida con esterilidad masculina citoplasmática del género *Lactuca* como material donador para proporcionar el citoplasma y la realización de fusión asimétrica de protoplastos con una lechuga de interés. Tal fusión asimétrica de protoplastos provoca, por ejemplo, recombinación o redistribución del genoma mitocondrial para mejorar las posibilidades de seleccionar líneas que mantienen la esterilidad masculina citoplasmática e incluyen un citoplasma que tiene mayor compatibilidad con el gen nuclear de la lechuga.

Una planta híbrida del género *Lactuca* que se produce y selecciona mediante el procedimiento descrito anteriormente comprende, en el citoplasma de la misma, un(os) gen(es) derivado(s) del citoplasma, concretamente mitocondrias de una planta del género *Helianthus*. La planta híbrida pertinente del género *Lactuca* comprende el genoma nuclear de la planta del género *Lactuca*, y preferiblemente comprende además el genoma cloroplástico de la planta del género *Lactuca*. La presente invención también se refiere a la planta híbrida pertinente del género *Lactuca*, la progenie de la misma, o una parte de la misma, tal como se describe en la reivindicación 1. En la presente invención, "la progenie de la planta híbrida del género *Lactuca*" significa las plantas híbridas del género *Lactuca* en la siguiente generación y la generación después de la siguiente que tuvieron éxito con el citoplasma pertinente mediante herencia citoplasmática, y que se obtienen mediante cruzamiento del polen de una planta del género *Lactuca* que puede cruzarse con la planta híbrida del género *Lactuca*. En la presente invención, "una parte de la planta híbrida del género *Lactuca* o la progenie de la misma" comprende una o más células de la planta pertinente, o el citoplasma de la una o más células, y en particular significa un(os) órgano(s) tal(es) como una flor, hoja, tallo y raíz; o una(s) célula(s) (incluyendo un(os) protoplasto(s) preparado(s) a partir de la(s) célula(s)) o el citoplasma de este/estos órgano(s) o tejido(s); o un agregado de las células o el citoplasma mencionados anteriormente.

(7) Uso de plantas con esterilidad masculina citoplasmática y la producción de semillas F1

Pueden obtenerse líneas favorables con esterilidad masculina citoplasmática mediante retrocruzamiento sucesivo de plantas favorables del género *Lactuca* con las plantas híbridas con esterilidad masculina citoplasmática del género *Lactuca* producidas mediante el método según la presente invención. Las líneas favorables resultantes con

esterilidad masculina citoplasmática pueden usarse como planta semillera parental para producir semillas F1.

Más preferiblemente, pueden crearse plantas semilleras parentales con esterilidad masculina citoplasmática en corto tiempo mediante el uso de las plantas híbridas con esterilidad masculina citoplasmática del género *Lactuca* producidas mediante la presente invención como material donador para proporcionar el citoplasma, y mediante la realización de fusión asimétrica de protoplastos entre el material donador y una lechuga de interés. Tal fusión asimétrica de protoplastos provoca, por ejemplo, recombinación o redistribución del genoma mitocondrial, y pueden seleccionarse líneas que mantienen la esterilidad masculina citoplasmática y que incluyen un citoplasma que tiene mayor compatibilidad con el gen nuclear de la lechuga.

Además, el citoplasma de las plantas híbridas con esterilidad masculina citoplasmática del género *Lactuca* producidas mediante la presente invención también pueden introducirse en otras especies del género *Lactuca*. Se conocen aproximadamente 100 especies silvestres de plantas del género *Lactuca*, y la variedad de lechuga cultivada *L. sativa* puede cruzarse con 9 especies silvestres en la subsección *Lactuca*: *L. serriola*, *L. aculeate*, *L. scarioloides*, *L. azerbaijanica*, *L. georgica*, *L. dregeana*, *L. altaica*, *L. saligna*, y *L. virosa* (documento de patente 17).

Si pueden cruzarse, las sustituciones del citoplasma y el núcleo pueden lograrse fácilmente mediante una técnica de reproducción convencional de retrocruzamiento sucesivo para crear combinaciones novedosas de citoplasma y núcleo (sustitución nuclear). Por tanto, puede introducirse fácilmente un citoplasma que expresa esterilidad masculina citoplasmática en estas especies silvestres o híbridos interespecíficos mediante cruzamiento de los mismos con una planta híbrida con esterilidad masculina citoplasmática del género *Lactuca* producida mediante la presente invención. Además, el alcance de aplicabilidad puede ampliarse mediante el cultivo de óvulos y embriones. Además, en el género *Lactuca*, se han creado muchos híbridos somáticos con especies silvestres mediante fusión de protoplastos con el propósito de introducir rasgos útiles de las especies silvestres (por ejemplo, documento de patente 17; Plant cell reports 9: 531-534 (1991); y documento no de patente 18). Tales especies silvestres incluyen, por ejemplo, *L. tatarica*, *L. virosa*, *L. indica*, *L. debilis*, etc., y puede introducirse el citoplasma de las plantas híbridas con esterilidad masculina citoplasmática del género *Lactuca* producidas mediante la presente invención en muchas de las especies silvestres del género *Lactuca* y sus híbridos interespecíficos usando estas técnicas de fusión de protoplastos. La introducción del citoplasma puede realizarse más eficazmente mediante irradiación e inactivación de los núcleos de las plantas híbridas con esterilidad masculina citoplasmática del género *Lactuca* producidas mediante la presente invención, y usando las mismas como células donadoras de citoplasma para realizar la fusión asimétrica de protoplastos. Por tanto, puede introducirse el citoplasma de las plantas híbridas con esterilidad masculina citoplasmática del género *Lactuca* producidas mediante la presente invención en muchas plantas del género *Lactuca* usando técnicas convencionales tales como retrocruzamiento sucesivo y técnicas de fusión de protoplastos. De manera conveniente, también puede introducirse esterilidad masculina citoplasmática en una planta híbrida interespecífica del género *Lactuca* en la que se han introducido genes útiles de especies silvestres.

Por consiguiente, puede lograrse la producción eficaz de semillas F1 de plantas del género *Lactuca* mediante el uso de, como planta semillera parental, una planta híbrida con esterilidad masculina citoplasmática del género *Lactuca* producida mediante la presente invención, o la progenie que se crea o se produce a partir de la planta pertinente mediante los procedimientos descritos anteriormente; cruzándolas con una planta con la que puede cruzarse del género *Lactuca* como planta polinífera parental; y recogiendo las semillas de la primera generación filial producidas por la planta semillera parental tras el cruzamiento. El método de cruzamiento no se limita a ningún método particular, sino que puede ser cualquier método convencional que permita la polinización de polen de la línea polinífera parental en los pistilos de la planta semillera parental, incluyendo, por ejemplo, polinización por el viento, polinización por insectos (por ejemplo, documento de patente 20) y cruzamiento artificial en el que se coloca manualmente polen de la línea polinífera parental en los pistilos de la planta semillera parental. Un método seleccionado preferiblemente es un método económico adecuado para la región y la facilidad de la producción de semillas.

La producción de variedades F1 de lechuga según los procedimientos anteriores permite la rápida reproducción de variedades de lechuga con rasgos favorables, y la producción de variedades de lechuga comercializables con calidad uniforme del producto y capacidad de adaptación al entorno superior, etc.

La presente invención se describe en detalle con los siguientes ejemplos, pero no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1

(1) Preparación de protoplastos

(i) Aislamiento de protoplastos de lechuga

Este ejemplo describe un procedimiento que usa la variedad de lechuga "Tell me" (Sakata Seed). Se sembraron en placas semillas esterilizadas sobre medio MS complementado con sacarosa 10 g/l y agar 8 g/l, y se cultivaron durante un mes a 20°C con 16 horas de luz al día. Se recogió aproximadamente 1 g de hojas abiertas, y se cortaron en trozos de aproximadamente 2 mm de tamaño. Se empaparon con 10 ml de la disolución de sales CPW que

contenía Meicelase al 0,4%, Maserozyme R-10 al 0,08% y manitol, y se incubó a 25°C durante 16 horas sin movimiento.

5 Se filtró la suspensión de protoplastos a través de malla de nailon de 92 micrómetros, y se centrifugó a 500 rpm durante 3 minutos. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 2 ml de disolución S que contenía yodoacetamida 15 mM, y se incubó a 25°C durante 5 minutos sin movimiento. Se centrifugaron los protoplastos
10 tratados con yodoacetamida a 300 rpm durante 3 minutos, y se resuspendieron en 10 ml de disolución S tras retirar el sobrenadante, y se lavaron 3 veces con disolución S. Tras centrifugación a 300 rpm durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en disolución de sales CPW que contenía sacarosa al 20% en un volumen final de 9,5 ml. Se dispusieron en una capa 0,5 ml de disolución S sobre la suspensión y esto se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos.

15 Se recogieron los protoplastos purificados, que se desplazaron hacia la fase superior en la disolución S, en un tubo para centrifuga con una pipeta Pasteur. Se suspendieron los protoplastos en 2 ml de disolución S y se retiró una pequeña cantidad de la suspensión para determinar la densidad celular de la suspensión de protoplastos usando un hemocitómetro. Se añadió disolución S a la suspensión hasta 1×10^6 células/ml.

(ii) Aislamiento de protoplastos de girasol

20 Este ejemplo describe un procedimiento que usa la variedad cultivada "Nozomi" (Sakata Seed) (que tiene los genes específicos de girasol orf522 y orf873) de girasol para flor cortada y la línea de reproducción "IB5" (que tiene uno de los genes específicos de girasol, el gen orf873, pero no orf522) de girasol para flor cortada. Se sembraron en placas
25 semillas esterilizadas sobre medio MS complementado con sacarosa 10 g/l y agar 8 g/l, y se cultivaron a 25°C en la oscuridad durante 7 días. Cuando los hipocótilos habían crecido hasta aproximadamente 50 mm, se cortaron a 1 cm de longitud, y se dividieron adicionalmente en mitades a lo largo de la dirección de elongación del hipocótilo. Se empaparon trozos cortados de aproximadamente 10 hipocótilos con 10 ml de disolución S que contenía celulasa Onozuka R-10 al 0,5% y Maserozyme R-10 al 0,1%, y se incubaron durante 16 horas sin movimiento.

30 Se filtró la suspensión de protoplastos a través de malla de nailon de 92 micrómetros. En un tubo para centrifuga, se transfirieron 2 ml de disolución de sales CPW que contenía sacarosa al 17%, y se dispuso sobre la misma la suspensión de protoplastos. Tras centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos, se reunieron los protoplastos purificados en una banda, y se retiró cuidadosamente la fase superior sobre la banda evitando la aspiración de protoplastos. Se suspendieron los protoplastos en un volumen final de 9,5 ml mediante la adición de disolución de sales CPW que contenía sacarosa al 17%. Se dispusieron como una capa 0,5 ml de disolución S sobre la suspensión y esto se
35 centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos.

40 Se recogieron los protoplastos, que se desplazaron hacia la fase superior en la disolución S, con pipeta Pasteur, se transfirieron a una placa de plástico y se expusieron a rayos X blandos a 0,5 Gy. Se transfirió la suspensión de protoplastos expuesta a los rayos X blandos a un tubo para centrifuga, y se enrasó a 9,5 ml con la disolución de sales CPW que contenía sacarosa al 17%. Se dispusieron como una capa 0,5 ml de disolución S sobre la suspensión y esto se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Se transfirieron los protoplastos que se desplazaron hacia la fase de disolución S a un tubo para centrifuga, y se enrasó la suspensión a 10 ml con disolución S. Se retiró una pequeña cantidad de la suspensión para determinar la densidad celular de la suspensión de protoplastos usando un hemocitómetro. Se añadió disolución S a la suspensión hasta 3×10^6 células/ml.
45

(2) Tratamiento de fusión de protoplastos

50 Se mezclaron los volúmenes iguales de la suspensión de protoplastos de lechuga tratada con yodoacetamida y la suspensión de protoplastos de girasol irradiada con rayos X blandos y se añadieron por goteo 2 ml de la mezcla sobre el centro del fondo de la placa de 9 cm. Tras incubación durante 30 minutos sin movimiento, se añadieron gota a gota 3 ml de disolución de PEG (PEG3350300 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.500 mg/l y KH_2PO_4 100 mg/l, pH 5,5) alrededor de la mezcla de protoplastos.

55 1 minuto después, se añadieron gota a gota 3,5 ml de la disolución de sales CPW alrededor de la mezcla de protoplastos. Otros 2 minutos después, se añadieron gota a gota 3,5 ml de la disolución de sales CPW alrededor de la mezcla de protoplastos de nuevo. 5 minutos después, se retiró el líquido añadido gota a gota en el borde de la placa mediante aspiración cuidadosa. Se añadieron 20 ml de la disolución de sales CPW en el borde de la placa. Se repitió este lavado con la disolución de sales CPW tres veces a intervalos de cinco minutos.

(3) Cultivo de células híbridas fusionadas

60 Tras retirar la disolución de lavado, se añadieron a los protoplastos 10 ml de medio MS de concentración 1/2 (pH 5,8) que contenía succinato de sodio hexahidratado 2,7 g/l, casaminoácidos 1,0 g/l, NAA 1,0 mg/l, BA 0,3 mg/l y sacarosa 0,3 M con la concentración de NH_4NO_3 reducida hasta 200 mg/l (a continuación en el presente documento, denominado medio de cultivo para protoplastos de lechuga), se cultivaron a 25°C en la oscuridad.
65

3 días tras el inicio del cultivo, se mezclaron 5 ml de medio de cultivo para protoplastos de lechuga concentrado 4 veces (con sacarosa 0,3 M) y 5 ml de disolución de sacarosa 0,3 M (pH 5,8) que contenía goma gelán al 0,6%, y se continuó con el cultivo en esta mezcla de medio en gel semisólido.

5 10 días tras el inicio del cultivo, se transfirieron 10 ml de cultivo que contenía células híbridas junto con el gel a 10 ml de medio de cultivo para protoplastos de lechuga en el que se modificó la concentración de sacarosa a 0,15 M. 20 días tras el inicio del cultivo, cuando se habían vuelto visibles microcallos a simple vista, se trasplantaron sobre el medio de cultivo para protoplastos de lechuga que contenía sacarosa al 1,0% y goma gelán al 0,3% (medio sólido, pH 5,8).

10

(4) Regeneración de plantas a partir de microcallos

30 días tras el inicio del cultivo, cuando los microcallos eran de aproximadamente 2 mm de tamaño, se transfirieron sobre medio MS (pH 5,8) que contenía NAA 0,1 mg/l, BA 0,3 mg/l, sacarosa al 1,0%, y agar al 0,8%. De 40 a 60 días tras el inicio del cultivo, se transfirieron los brotes rediferenciados a partir de los callos sobre medio MS 1/2 (pH 5,8) que contenía sacarosa al 1,0% y agar al 0,8%, y les crecieron raíces y se regeneraron para dar las plantas híbridas. Se transfirieron las plantas híbridas a vermiculita, se aclimataron y se hicieron crecer en un invernadero.

15

(5) Selección de plantas híbridas que tienen un gen mitocondrial específico de girasol

20

Se extrajo el ADN total de hojas de las plantas híbridas según un método conocido en la técnica (Jhingan, A. K. (1992) Methods in molecular and cellular biology 3: 15-22). Para detectar ADN específico de girasol mediante PCR, se diseñaron cebadores específicos para los genes orf522 y orf873 (tabla 3) basándose en la información de secuencia de ácido nucleico disponible de manera pública en la técnica (n.º de registro Gene Bank Z23237 y X62592). Se usaron las combinaciones de cebadores orf522-F y orf522-R, cebadores orf873-F y orf873-R para PCR usando como molde ADN genómico completo extraído. Se realizó PCR con 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 60°C durante 2 minutos, y elongación a 72°C durante 2 minutos. Se separaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8%, se empaparon con disolución de bromuro de etidio, y se fotografiaron bajo luz UV para determinar si estaban presentes bandas con los tamaños esperados de 209 pb y 798 pb.

25

30

Tabla 3

Cebadores y sus secuencias de ácido nucleico usados en la presente invención

Gen	Nombre de cebador	Secuencia (de 5' a 3')
orf522	orf522-F	cgtccttgctgagggtttg
	orf522-R	tgagtaccgttctctcagagttg
orf873	orf873-F	gctactcggacgaaaactaggaac
	orf873-R	cccaacttcacgcggaacag
rbcL	rbcL-F	tcaacctggagtccgcctgaag
	rbcL-R	gtgccctaaagttcctccaccgaa
atp6	atp6-F	gctaactctcagtttgctctac
	atp6-R	ccagaccggttaatgcaaga
coxII	coxII-F	ctggctaccgtaatctccaa
	coxII-R	cttgcaagtttccccgcaa
cob	cob-F	tcttcccacactgaatcagca
	cob-R	agaatggcgttatggcaaag
rps3	rps3-F	ggaaatccgatttcggtaag
	rps3-R	agggtccttttaagtggatg
trnN	trnN-F	gagcogtccgctgtaactg
trnY	trnY-R	cagattacagctgtcgcctttaacc
trnS	trnS-F	ggcattggttgctaaatcgacatac
trnP	trnP-R	acctatggcctctgtaccc

35

Para examinar la amplificación específica de los fragmentos de ADN diana, Se extrajo ADN de 2 líneas de girasol con esterilidad masculina citoplasmática, 1 línea de girasol con fertilidad masculina (la línea de reproducción "OSO6") y 13 variedades cultivadas de lechuga enumeradas en la tabla 4, y se realizó PCR usando los cebadores específicos para los genes mitocondriales de girasol orf522 y orf873. En la figura 1, se muestran los resultados. La figura 1 es una fotografía de electroforesis que muestra el resultado de PCR usando los cebadores específicos para los genes mitocondriales de girasol orf522 (parte superior) y orf873 (parte inferior) y ADN extraído de 2 líneas de girasol con esterilidad masculina citoplasmática (carriles 1 y 2), 1 línea de girasol con fertilidad masculina (carril 3) y 13 variedades cultivadas de lechuga (carriles 4 a 16) como materiales de prueba (símbolos en la figura 1: M: marcador de peso molecular, 1: Nozomi, 2: IB5, 3: OSO6, 4: Tell me, 5: Steady, 6: Logic, 7: Miya, 8: V lettuce, 9: Santanasu, 10: Sirius, 11: Asure, 12: Brutus 7, 13: Spark, 14: Santos 2 2, 15: Dejero, 16: Souther). Tal como se

40

45

muestra en la figura 1, se detectaron las bandas de orf522 (209 pb) y orf873 (798 pb) en la variedad cultivada de girasol "Nozomi", y se detectó la banda de orf873 (798 pb) en la línea de reproducción de girasol "IB5". Por otra parte, no se detectó ninguna banda en las 13 variedades de lechuga que se examinaron. Este resultado confirmó que no se produce amplificación específica de ADN en PCR con los cebadores específicos para orf522 y para orf873 usando como molde ADN de lechuga. Basándose en este resultado, es posible seleccionar las plantas híbridas que tienen un gen mitocondrial específico para girasol mediante la extracción de ADN de las plantas obtenidas mediante fusión asimétrica de protoplastos, y realización de PCR.

La figura 2 muestra un resultado a modo de ejemplo de las pruebas de las plantas híbridas obtenidas mediante este ejemplo. La figura 2 es una fotografía de electroforesis que muestra un resultado a modo de ejemplo de las pruebas de las plantas híbridas usando los cebadores específicos para los genes mitocondriales de girasol orf522 y orf873 (símbolos en la figura 2: M: marcador de peso molecular, 1: Nozomi, 2 a 7: las plantas híbridas producidas mediante el uso de "Nozomi" como material donador para proporcionar el citoplasma, 8: IB5, 9 a 14: las plantas híbridas producidas mediante el uso de "IB5" como material donador para proporcionar el citoplasma). Se usaron dos variedades de girasol "Nozomi" e "IB5" como donador de citoplasma, y fue posible la producción de plantas híbridas usando cualquier citoplasma.

Se detectó que la banda de orf873 estaba ausente en los carriles 3 y 5 en la figura 2 a pesar de que se introdujo orf522 en tales individuos. Esto puede ser el resultado de la recombinación en mitocondrias.

Tabla 4

Variedades fértiles de lechuga usadas para someter a prueba la especificidad de los cebadores

N.º	Nombre de variedad	□sterilidad masculina	Proveedor
1	Tell me	Fértil	Sakata Seed Corporation
2	Steady	Fértil	Tsuruta Seed Co., Ltd.
3	Logic	Fértil	The Yokohama Nursery Co., Ltd.
4	Miya	Fértil	Sumika Agrotech Co., Ltd.
5	V lettuce	Fértil	Kaneko Seed Co., Ltd.
6	Santanasu	Fértil	Sakata Seed Corporation
7	Sirius	Fértil	Sakata Seed Corporation
8	Asure	Fértil	Sumika Agrotech Co., Ltd.
9	Brutus 7	Fértil	The Yokohama Nursery Co., Ltd.
10	Spark	Fértil	Watanabe Nouji Co., Ltd.
11	Santos 2	Fértil	Fujii Seed Co., Ltd.
12	Dejero	Fértil	Sumika Agrotech Co., Ltd.
13	Souther	Fértil	TAKII & CO., LTD.

Con el fin de determinar la fuente de cloroplastos mediante PCR-RFLP, se diseñaron cebadores específicos para el gen cloroplástico de girasol rbcL (tabla 3) basándose en la información de secuencia de ácido nucleico disponible de manera pública en la técnica (n.º de registro Gene Bank L13929). Se realizó PCR con la combinación de cebadores rbcL-F y rbcL-R usando como molde ADN genómico completo extraído. Se realizó PCR con 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 60°C durante 2 minutos y elongación a 72°C durante 2 minutos. Se digirieron los productos de PCR con la enzima de restricción TaqI, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8%, se empaparon con disolución de bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz UV, para determinar cómo se digirieron. Debido a que los genes rbcL genes de girasol y lechuga son altamente homólogos, y producen los productos amplificados del mismo tamaño, fue necesario digerir los productos de PCR con la enzima de restricción TaqI. Se hizo posible la determinación de la fuente de cloroplastos mediante la detección de RFLP en las diferencias de los sitios de enzima de restricción. La figura 3 es una fotografía de electroforesis que muestra el patrón de PCR-RFLP, en el que se extrajo ADN de 2 líneas de girasol con esterilidad masculina citoplasmática (carriles 1 y 2), 1 línea de girasol con fertilidad masculina (carril 3) y 13 variedades cultivadas de lechuga (carriles 4 a 16), se realizó PCR usando los moldes de ADN y los cebadores específicos para el gen cloroplástico rbcL, y se cortaron con TaqI los productos amplificados (símbolos en la figura 3: M: marcador de peso molecular, 1: Nozomi, 2: IB5, 3: OSO6, 9: Tell me, 5: Steady, 6: Logic, 7: Miya, 8: V lettuce, 9: Santanasu, 10: Sirius, 11: Asure, 12: Brutus 7, 13: Spark, 14: Santos 2 2, 15: Dejero, 16: Souther). Tal como se muestra en figura 3, aunque el producto amplificado procedente del gen de lechuga no contiene sitios de restricción TaqI, y se detecta de ese modo como una única banda de 1096 pb de tamaño, el producto procedente del girasol contiene un sitio de restricción TaqI, y se detecta de ese modo como dos bandas de 311 pb y 785 pb de tamaño. Por tanto fue fácil distinguir la fuente de los cloroplastos. Este resultado demostró que era posible seleccionar las plantas híbridas con cloroplastos de lechuga mediante la extracción de ADN de las plantas obtenidas mediante fusión asimétrica de protoplastos y realización de PCR-RFLP.

(6) Selección de plantas con esterilidad masculina citoplasmática

Debido a la incompatibilidad entre los genes nucleares de la lechuga y los genes mitocondriales del girasol introducidos, muchos individuos de tales plantas híbridas muestran anomalías morfológicas. Se retiraron aquellos individuos con una anomalía morfológica. Puesto que el genoma mitocondrial experimenta la recombinación y redispersión a altas frecuencias en la fusión de protoplastos, se observaron variaciones morfológicas en cada individuo de las plantas regeneradas. Debido a que el órgano floral es particularmente susceptible a las anomalías morfológicas debido a la incompatibilidad, se produjeron muchas plantas y se examinaron para detectar líneas favorables que presentasen esterilidad masculina y morfologías normales en otros aspectos. Generalmente, la lechuga presenta protandria y se poliniza cuando el pistilo está todavía elongándose en el tubo de anteras, por tanto en el momento de la floración, se adhiere una gran cantidad de polen al pistilo tal como se muestra en la figura 4. Por este motivo, la lechuga tiene tasas muy altas de autopolinización. En el candidato más deseable de línea con esterilidad masculina citoplasmática (a continuación en el presente documento, denominada "1216-2" (derivada de "IB5" de girasol)) que se seleccionó en la presente invención, no había polen en absoluto adherido sobre el pistilo, y ni siquiera en los tubos de anteras había ningún signo de polen, tal como se muestra en la figura 5. Además, no se observaba una clara diferencia en las morfologías del órgano floral y otros órganos. Además, la investigación del número de cromosomas confirmó que era de $2n = 18$, igual que en la lechuga normal (figura 6).

Cuando se cruzó la línea con esterilidad masculina citoplasmática seleccionada "1216-2" con polen de lechuga con citoplasma normal, fructificó y produjo semillas normalmente tal como se muestra en la figura 7. Esto confirmó que se mantenía la fertilidad femenina en la línea.

Además, cuando se cruzó "1216-2" con una lechuga con fertilidad masculina, todas las plantas de la progenie presentaron esterilidad masculina. Esto confirmó que la esterilidad masculina se producía en el citoplasma, y se transmitía mediante herencia citoplasmática.

La figura 8 muestra el resultado de PCR con los cebadores específicos para el gen mitocondrial de girasol orf873, para someter a prueba 14 individuos en la generación BC3 tras el segundo retrocruzamiento de "1216-2" con "Tell me" (símbolos en la figura 8: M: marcador de peso molecular, S: IB5, L: Tell me, 1 a 14: 14 individuos en la generación BC3 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática (1216-2-T1-1 a 14)). Todos los individuos tenían orf873. Este resultado demostró que el gen mitocondrial de girasol se transmitía de modo estable.

Además, se diseñaron los cebadores enumerados en la tabla 3 basándose en la información de secuencia de ácido nucleico de genes mitocondriales en girasol y lechuga, disponible de manera pública en la técnica (n.º de registro Gene Bank X82387, X62341, X98362, AF319170, X73425 y X87209) y se analizaron otros genes mitocondriales usando los métodos de PCR y PCRRFLP. Se analizaron gen mitocondrial rps3, la región intergénica entre trnN y trnY (a continuación en el presente documento, denominada trnN-trnY) y la región intergénica entre trnS y trnP (a continuación en el presente documento, denominada trnS-trnP) distinguiendo los genotipos a partir de la diferencia de tamaño de los productos de amplificación por PCR, y se analizaron los genes mitocondriales atp6, cox II y cob mediante PCR-RFLP, es decir mediante la digestión de los productos de amplificación por PCR con enzimas de restricción. Es decir, se digirió el producto de amplificación por PCR por la enzima de restricción y basándose en la diferencia en el patrón de digestión. Además, se analizó el gen cloroplástico rbcL mediante PCR-RFLP. La figura 9 es una fotografía de electroforesis que resulta de los experimentos de PCR y PCR-RFLP (símbolos en la figura 9: M: marcador de peso molecular, S: IB5, L: Tell me, 1 a 14: 14 individuos en la generación BC3 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática (1216-2-T1-1 a 14)). En la tabla 5, también se resumen los resultados

Tabla 5

Análisis del citoplasma en la progenie en la generación BC3 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática "1216-2" mediante métodos de PCR y PCR-RFLP

Nombre de la variedad o línea	Esterilidad masculina	Gen mitocondrial						Gen cloroplástico
		atp6	coxII	cob	rps3	trnNtrnY	trnStrnP	
IB5	Estéril	Sun	Sun	Sun	Sun	Sun	Sun	Sun
Tell Me	Fértil	Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-1	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-2	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-3	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-4	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-5	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-6	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-7	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-8	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-9	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-10	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-11	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-12	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-13	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let
1216-2-T1-14	Estéril	Sun	Let	Let	Let	Let	Let	Let

Sun: Tipo girasol,

Let: Tipo lechuga

5 Este resultado indicó que el gen mitocondrial atp6 aparecía en el tipo de girasol, pero otros genes mitocondriales analizados aparecían en el tipo de lechuga. La figura 10 es una fotografía de electroforesis que muestra el resultado de PCR-RFLP, en el que se extrajo ADN de 14 individuos en la generación BC3 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática, se realizó PCR usando los moldes de ADN y los cebadores específicos para el gen cloroplástico rbcL, y se digirieron los productos de amplificación por PCR adicionalmente con una enzima de restricción (símbolos en la figura 10: M: marcador de peso molecular, S: IB5, L: Tell me, 1 a 14: 14 individuos en la generación BC3 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática (1216-2-T1-1 a 14)). El resultado de PCR-RFLP mostrado en la figura 10 demostró que el gen cloroplástico rbcL también aparecía en el tipo de lechuga en todos los individuos. Por tanto, se encontró que sólo una parte de los genes mitocondriales de girasol se incorporaba a la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática producida en la presente invención, y los cloroplastos se derivaban de lechuga. Además, los 14 individuos de la progenie usada para las pruebas aparecieron con el mismo patrón de bandas. Esto indicó que el genoma mitocondrial era estable en la progenie. Sin embargo, los resultados mostrados en las figuras 9, 10, y la tabla 5 son únicamente resultados a modo de ejemplo del análisis en individuos que expresan esterilidad masculina citoplasmática, y los patrones de bandas en lechuga con esterilidad masculina citoplasmática no tienen necesariamente el mismo patrón.

20 Los resultados anteriores demostraron que puede producirse una lechuga con esterilidad masculina citoplasmática mediante la introducción de una parte de ADN mitocondrial de girasol mediante fusión asimétrica de protoplastos. Basándose en los resultados del análisis del citoplasma hasta la fecha, se consideró que la esterilidad masculina se producía mediante la inducción de recombinación del/de los gen(es) mitocondrial(s) que es/son responsable(s) de la esterilidad masculina, o la redistribución del genoma mitocondrial.

25 Por tanto, se encontró que la planta híbrida creada mediante la presente invención era una lechuga con esterilidad masculina citoplasmática con una recombinación elaborada del genoma mitocondrial, que tiene el rasgo de esterilidad masculina citoplasmática debido a la alteración de genoma mitocondrial, y al mismo tiempo, tiene el genoma mitocondrial sumamente compatible con el genoma nuclear de la lechuga.

30 (7) Uso de plantas con esterilidad masculina citoplasmática y la producción de semillas F1

35 Se cruzó la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática producida, por ejemplo "1216-2-T1", que es la progenie de cruzamiento de "1216-2" con "Tell me", con 5 variedades genéticamente puras disponibles comercialmente "Tell me" (Sakata Seed Corporation), "Steady" (Tsuruta Seed), "Logic" (The Yokohama Nursery Co., Ltd.), "Miya" (Sumika Agrotech Co., Ltd.) y "V lettuce" (Kaneko Seed) como planta polinífera parental, y se recogieron las semillas F1.

40 Tras sembrar las semillas F1 sobre una bandeja encajada y producir las plántulas, se plantaron en macetas n.º 10 y se hicieron crecer tal como es habitual en un invernadero, y entonces se investigaron para determinar sus propiedades. Se sometieron a prueba 3 cepas para cada línea o variedad. Todas las líneas y variedades crecieron normalmente. Se investigó la esterilidad masculina de cada línea o variedad con 10 flores para cada cepa. Se usó un microscopio estereoscópico para las observaciones detalladas. Se observaron el color de los pétalos y la forma de los órganos florales uno a uno cuando florecieron, y también se examinó la presencia de semillas autopolinizadas tras la floración. En la tabla 6, se mostraron los resultados de los exámenes. Todas las líneas F1 individuales

incluyendo "1216-2-T1" y las 5 variedades genéticamente puras anteriores presentaron el 100% de esterilidad masculina. Además, tal como se muestra en las figuras 11 a 14, no se observó en absoluto la adhesión de polen sobre el pistilo mediante autopolinización, tampoco en los casos de cruzamiento con las variedades de lechuga distintas a "Tell me", y no hubo ningún signo de polen en las anteras. Además, tal como se muestra en la figura 15, no se observó la adhesión de polen sobre el pistilo mediante autopolinización en una progenie híbrida desarrollada a partir de cruzamiento con polen de la especie silvestre de lechuga *L. serriola*, y tampoco hubo ningún signo de polen en las anteras.

Este resultado demostró que se mantenía la esterilidad masculina sin producir ninguna cantidad de polen si siquiera cuando se cambiaron los genes nucleares a un genotipo distinto a "Tell me", y se confirmó que su esterilidad masculina se producía en el citoplasma. Por tanto, se demostró que las plantas híbridas producidas según la presente invención mostraban esterilidad masculina citoplasmática estable.

Además, se investigó la fertilidad femenina de las líneas con esterilidad masculina citoplasmática, que no producen polen, mediante cruzamiento con polen de la misma variedad usada para producir F1. Se examinaron 10 flores para una cepa, y las líneas o variedad con la capacidad para producir 10 o más semillas por flor se puntuaron como "sí" en cuanto a la fertilidad femenina. Tal como se muestra en la tabla 6, todas las líneas con esterilidad masculina citoplasmática tenían fertilidad femenina independientemente de la diferencia en el genotipo. Esto confirmó que puede usarse la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática producida según la presente invención para la producción eficaz de semillas F1.

Tabla 6

Análisis de las propiedades en el órgano floral de plantas F1 entre variedades de prueba de lechuga y lechuga con esterilidad masculina citoplasmática en la generación BC3 "1216-2-T1"

Línea o variedad	Tasa de producción de polen (%)	Color del pétalo	Anomalía en el órgano floral	Semilla de autopolinización	Fertilidad femenina
Tell Me	100	Amarillo	No	Sí	Sí
Steady	100	Amarillo	No	Sí	Sí
Logic	100	Amarillo	No	Sí	Sí
Miya	100	Amarillo	No	Sí	Sí
V lettuce	100	Amarillo	No	Sí	Sí
1216-2-T1 x Tell Me	0	Amarillo	No	No	Sí
1216-2-T1 x Steady	0	Amarillo	No	No	Sí
1216-2-T1 x Logic	0	Amarillo	No	No	Sí
1216-2-T1 x Miya	0	Amarillo	No	No	Sí
1216-2-T1 x V lettuce	0	Amarillo	No	No	Sí

Tasa de producción de polen: número de flores que producen polen / número total de flores examinadas.

Se depositaron las semillas de "1216-2-T1", la progenie del cruzamiento entre "1216-2" y "Tell me" ante el Depositorio Internacional de Organismos de Patentes en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Chuo 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) el 29 de septiembre de 2005 (referencia de identificación facilitada por el depositante SSCLET-05-001 y número de registro FERM BP-10421).

Ejemplo 2

Se produjo la planta híbrida con esterilidad masculina citoplasmática "50125-3" usando "1216-2-T1" como material donador para proporcionar el citoplasma y realizando fusión asimétrica de protoplastos con "V lettuce" (Kaneko Seed). En la flor de "50125-3", no se observaron granos de polen adheridos al pistilo, y tampoco se observaron granos de polen en la antera de la flor. Además, no se observaron diferencias obvias en la forma del órgano floral y similares, en comparación con "V lettuce". Cuando se cruzó la línea con esterilidad masculina citoplasmática seleccionada "50125-3" con polen de una lechuga con citoplasma normal, fructificó y produjo semillas normalmente. Esto confirmó que se mantenía la fertilidad femenina en la línea. Además, cuando se cruzó "50125-3" con polen de una lechuga con fertilidad masculina, todas las plantas de la progenie tenían esterilidad masculina. Esto confirmó que la esterilidad masculina se producía por el citoplasma y era de herencia citoplasmática.

La tabla 7 muestra los resultados del análisis de PCR y PCR-RFLP de genes mitocondriales de diez individuos

“50125-3-V1-1 a -10” que son progenies obtenidas mediante cruzamiento “50125-3” con “V lettuce”. Se observó, por ejemplo, que se mantenían los genes *atp6* tanto de tipo girasol como de tipo lechuga *atp6* en “50125-3-V1-1 a -10”, como diferencia en comparación con “1216-2-T1” usada como material donador para proporcionar el citoplasma.

5 Sin embargo, los resultados mostrados en la figura 7 son resultados a modo de ejemplo del análisis en individuos que expresan esterilidad masculina citoplasmática, y los patrones de bandas en lechuga con esterilidad masculina citoplasmática no tienen necesariamente el mismo patrón.

10 Se depositaron las semillas de “50125-3-V1”, la progenie del cruzamiento entre “50125-3” y “V lettuce” ante el Depositorio Internacional de Organismos de Patentes en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Chuo 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) el 31 de julio de 2006 (referencia de identificación facilitada por el depositante SSC-LET-06-001 y número de registro FERM BP-10647).

Tabla 7

15 Análisis del citoplasma en la progenie en la generación BC2 de la lechuga con esterilidad masculina citoplasmática “50125-3-V1” mediante métodos de PCR y PCR-RFLP

Nombre de la variedad o línea	Esterilidad masculina	Gen mitocondrial							Gen cloro-plástico
		orf783	<i>atp6</i>	<i>coxII</i>	<i>cob</i>	<i>rps3</i>	trnNtrn Y	trnStrn P	
IB5	Estéril	+	Sun	Sun	Sun	Sun	Sun	Sun	Sun
V lettuce	Fértil	-	Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
50125-3-V1-1	Estéril	+	Sun + Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
50125-3-V1-2	Estéril	+	Sun + Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
50125-3-V1-3	Estéril	+	Sun + Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
50125-3-V1-4	Estéril	+	Sun + Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
50125-3-V1-5	Estéril	+	Sun + Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
50125-3-V1-6	Estéril	+	Sun + Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
50125-3-V1-7	Estéril	+	Sun + Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
50125-3-V1-8	Estéril	+	Sun + Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
50125-3-V1-9	Estéril	+	Sun + Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let
50125-3-V1-10	Estéril	+	Sun + Let	Let	Let	Let	Let	Let	Let

20 +: presente, -: ausente

Sun: Tipo girasol, Let: Tipo lechuga

25 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención proporciona una lechuga cíbrida que tiene citoplasma derivado de girasol. Cuando la lechuga cíbrida según la presente invención es una lechuga con esterilidad masculina citoplasmática, puede lograrse la producción eficaz y de alta pureza de semillas F1 mediante el uso de esta lechuga como planta semillera parental, a diferencia de la producción comercial de semillas F1 usando una planta con esterilidad masculina genética.

30 **Lista de secuencias**

<110> Planta híbrido citoplasmática perteneciente al género *Lactuca* y método para producir la misma

35 <120> Sakata Seed Corporation

<130> PH-2882-PCT

<150> Documento JP 2005-311598
<151> 2005-10-26
5 <160> 18
<170> PatentIn Ver. 2.1
10 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
<400> 1
 cgtccttgcg tgagggttg 20
25 <210> 2
<211> 24
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
<400> 2
 tgagtaccgt tctctcacga gttg 24
40 <210> 3
<211> 24
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial
<220>
50 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
<400> 3
 gctactcgga cgaaaactag gaac 24
55 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial
<220>

	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 4	
	cccaacttca cgcggaacag	20
5	<210> 5	
	<211> 23	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 5	
	tcaacctgga gttccgcctg aag	23
20	<210> 6	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 6	
	gtgccctaaa gttcctccac cgaa	24
35	<210> 7	
	<211> 23	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 7	
	gctaactctc agtttggtcc tac	23
50	<210> 8	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 8	

	ccagaccggt taatgcaaga	20
	<210> 9	
5	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 9	
	ctggcttacc ggtaatctcc aa	22
	<210> 10	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 10	
	cttgcaagtt tccccgcaaa	20
	<210> 11	
35	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 11	
	tcttctccac actgaatcag ca	22
	<210> 12	
50	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 12	
	agaatgggcg ttatggcaaa g	21

	<210> 13	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 13	
	ggaaatccga ttctggtaag	20
15	<210> 14	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 14	
	agggtccttt taagtggatg	20
30	<210> 15	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 15	
	gagcggtcgg ctgttaactg	20
45	<210> 16	
	<211> 27	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 16	
	cagatttaca gtctgtcgct ttaacc	27
60	<210> 17	
	<211> 26	

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

10 <400> 17 **ggcattggtt tgctaaatcg acatac** 26

<210> 18

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

25 <400> 18 **acctatggcc ctctgtaccc** 20

REIVINDICACIONES

1. Planta cíbrida del género *Lactuca*, progenie de la misma, o parte de la misma, que comprende, en el citoplasma de la misma, un gen derivado de las mitocondrias de una planta del género *Helianthus* y que tiene esterilidad masculina citoplasmática,
- en la que la planta cíbrida se produce mediante un método caracterizado porque comprende: fusionar protoplastos de una planta del género *Helianthus* con protoplastos de una planta del género *Lactuca*; cultivar una o más de las células fusionadas; y en la que la etapa de cultivo de las células fusionadas comprende cultivar las células fusionadas en un medio líquido; y luego añadir goma gelán al medio y continuar con el cultivo, en la que la goma gelán se añade a los de 3 a 7 días tras el inicio del cultivo y regenerar una planta del género *Lactuca* a partir de células cultivadas de una o más de las células fusionadas.
2. Planta cíbrida del género *Lactuca*, o progenie de la misma, o parte de la misma según la reivindicación 1, en la que la planta del género *Helianthus* es *H. annuus* L. o una línea de sustitución citoplasmática de *H. annuus* L. con citoplasma de *H. petiolaris*, *H. argophyllus*, *H. debilis*, *H. decapetalus*, *H. giganteus*, *H. rigidus*, *H. salicifolius*, *H. anomalus*, *H. bolanderi*, *H. exilis*, *H. maximiliani*, *H. neglectus*, *H. praecox* o *H. tuberosus*.
3. Planta cíbrida del género *Lactuca*, o progenie de la misma, o parte de la misma según la reivindicación 1 ó 2, en la que la planta cíbrida del género *Lactuca* se deriva de *Lactuca sativa* L., *L. serriola*, *L. aculeate*, *L. scarioloides*, *L. azerbaijanica*, *L. georgica*, *L. dregeana*, *L. altaica*, *L. saligna*, *L. virosa*, *L. tatarica*, *L. indica* o *L. debilis* o la planta híbrida interespecífica de las mismas.
4. Planta cíbrida del género *Lactuca*, o progenie de la misma, o parte de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el gen derivado de las mitocondrias de una planta del género *Helianthus* es un gen de esterilidad masculina.
5. Microcallo que comprende células de la planta cíbrida del género *Lactuca* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Parte de una planta cíbrida del género *Lactuca* hecha crecer a partir de una semilla de la planta cíbrida del género *Lactuca* que se ha depositado con el n.º de registro FERM BP-10421, o la progenie de la misma, en la que la parte es el citoplasma del/de los órgano(s) o tejido(s) de la planta cíbrida.
7. Parte de una planta cíbrida del género *Lactuca* hecha crecer a partir de una semilla de la planta cíbrida del género *Lactuca* que se ha depositado con el n.º de registro FERM BP-10647, o la progenie de la misma, en la que la parte es el citoplasma del/de los órgano(s) o tejido(s) de la planta cíbrida.
8. Parte de la planta cíbrida del género *Lactuca* o progenie de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la parte es el citoplasma del/de los órgano(s) o tejido(s) de la planta cíbrida.
9. Parte de la planta cíbrida del género *Lactuca* o progenie de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la parte comprende una célula o un citoplasma de la planta.
10. Método para producir una planta cíbrida del género *Lactuca* que comprende, en el citoplasma de la misma, un gen derivado de las mitocondrias de una planta del género *Helianthus* y que tiene esterilidad masculina citoplasmática, caracterizado porque comprende: fusionar protoplastos de una planta del género *Helianthus* con protoplastos de una planta del género *Lactuca*; cultivar una o más de las células fusionadas; y regenerar una planta del género *Lactuca* a partir de células cultivadas de una o más de las células fusionadas, y en el que la etapa de cultivo de las células fusionadas comprende cultivar las células fusionadas en un medio líquido; y luego añadir goma gelán al medio y continuar con el cultivo, en el que la goma gelán se añade a los de 3 a 7 días tras el inicio del cultivo.
11. Método según la reivindicación 10, en el que los protoplastos de una planta del género *Helianthus* son protoplastos de una planta de *H. annuus* L., o protoplastos de una línea de sustitución citoplasmática de *H. annuus* L. con citoplasma de *H. petiolaris*, *H. argophyllus*, *H. debilis*, *H. decapetalus*, *H. giganteus*, *H. rigidus*, *H. salicifolius*, *H. anomalus*, *H. bolanderi*, *H. exilis*, *H. maximiliani*, *H. neglectus*, *X. praecox* o *H. tuberosus*.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que los protoplastos de una planta del género *Lactuca* son protoplastos de *Lactuca sativa* L., *L. serriola*, *L. aculeate*, *L. scarioloides*, *L. azerbaijanica*, *L. georgica*, *L. dregeana*, *L. altaica*, *L. saligna*, *L. virosa*, *L. tatarica*, *L. indica* o *L. debilis*, o una planta híbrida interespecífica de las mismas.

13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la planta del género *Helianthus* tiene esterilidad masculina citoplasmática.
- 5 14. Método según la reivindicación 13, en el que la planta del género *Helianthus* tiene un gen de esterilidad masculina en las mitocondrias de la misma, y el gen se incorpora en el citoplasma de la planta híbrida del género *Lactuca*.
- 10 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que comprende además seleccionar, de las plantas regeneradas del género *Lactuca*, un individuo en el que el gen mitocondrial de la planta del género *Helianthus* se ha introducido con el uso de PCR o PCR-RFLP.
- 15 16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, que comprende además seleccionar, de las plantas regeneradas del género *Lactuca*, un individuo que tiene un gen de cloroplasto derivado de la planta del género *Lactuca* con el uso de PCR-RFLP.

Figura 1

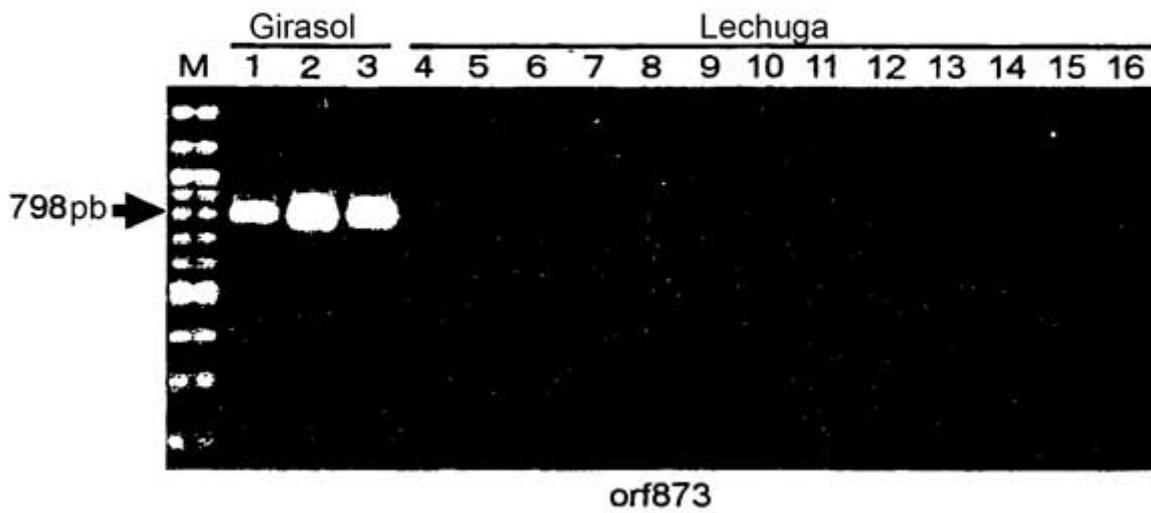
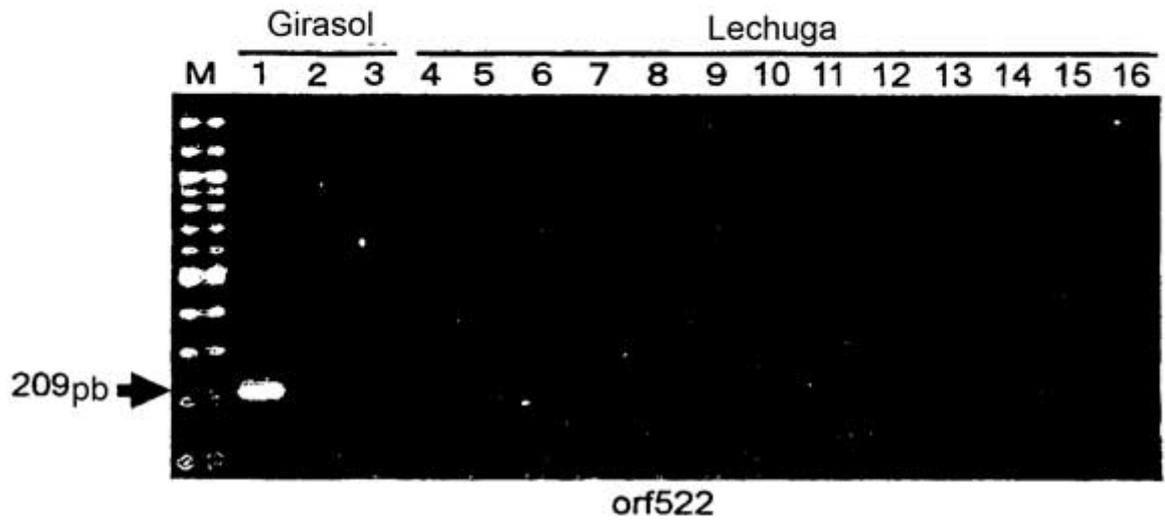


Figura 2

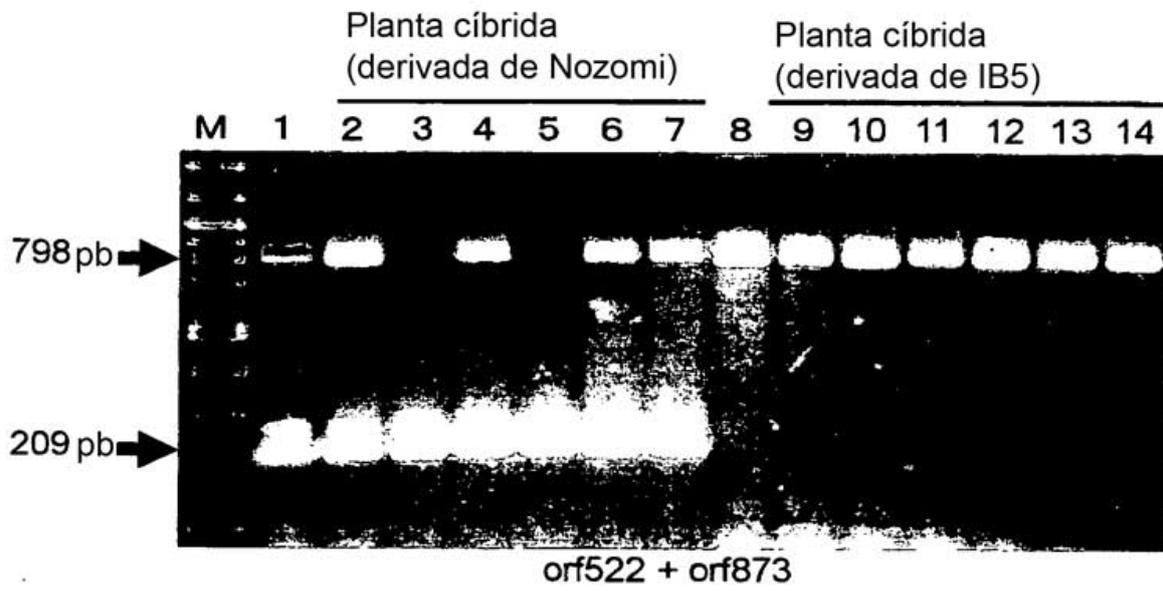


Figura 3

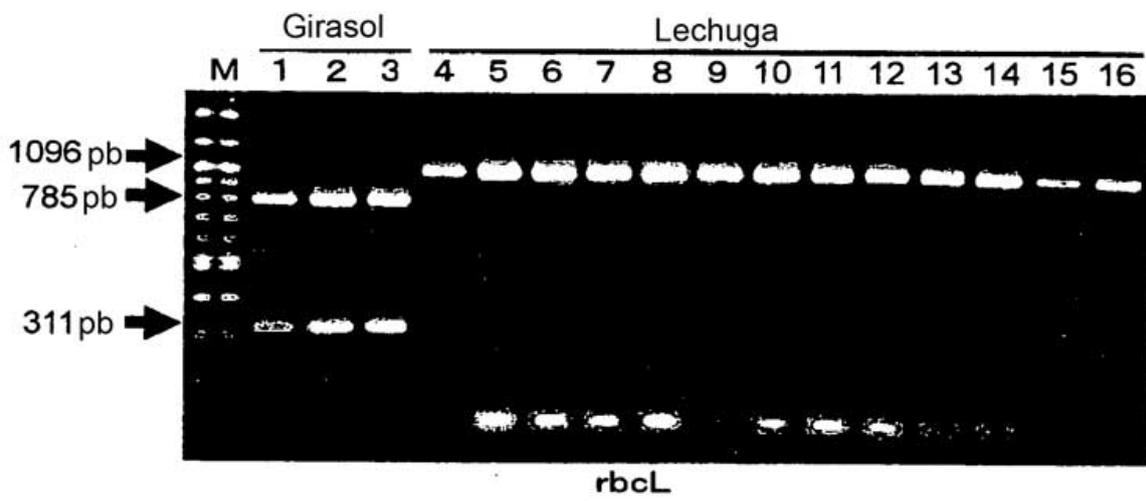


Figura 4



Figura 5

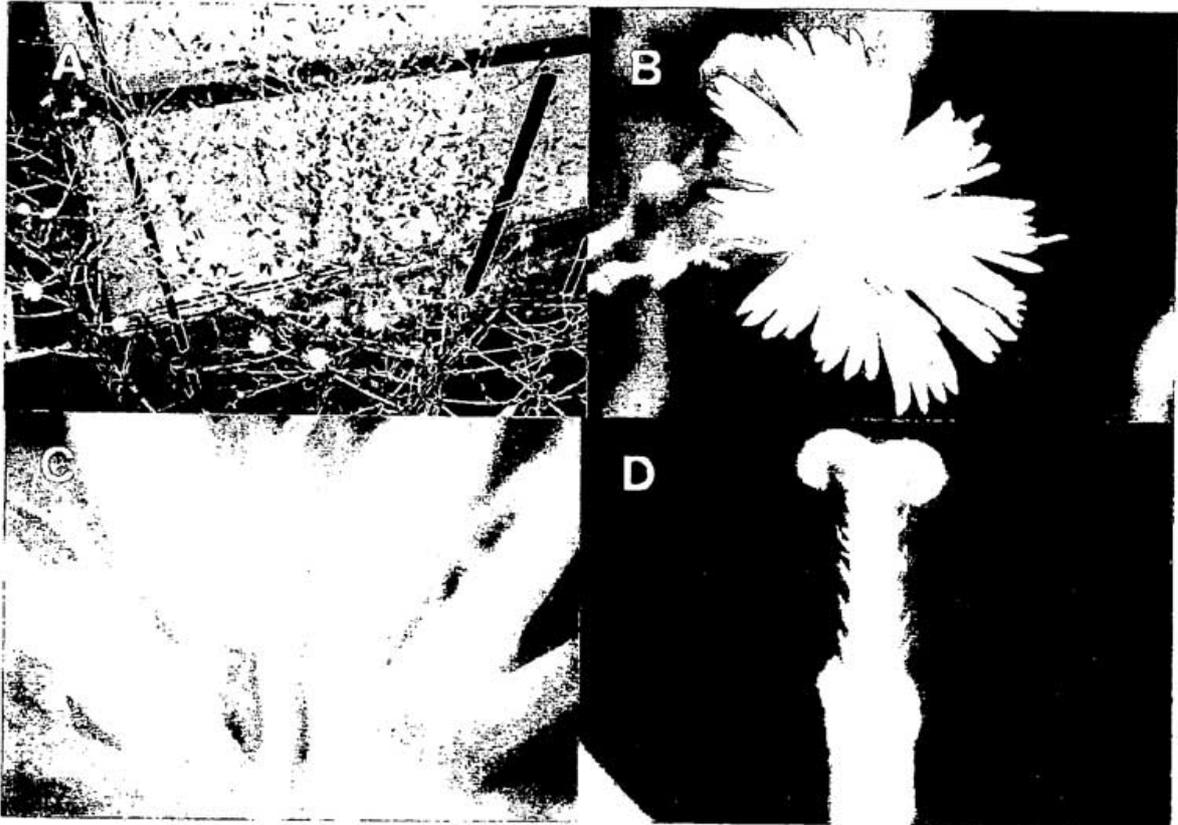


Figura 6



Figura 7



Figura 8

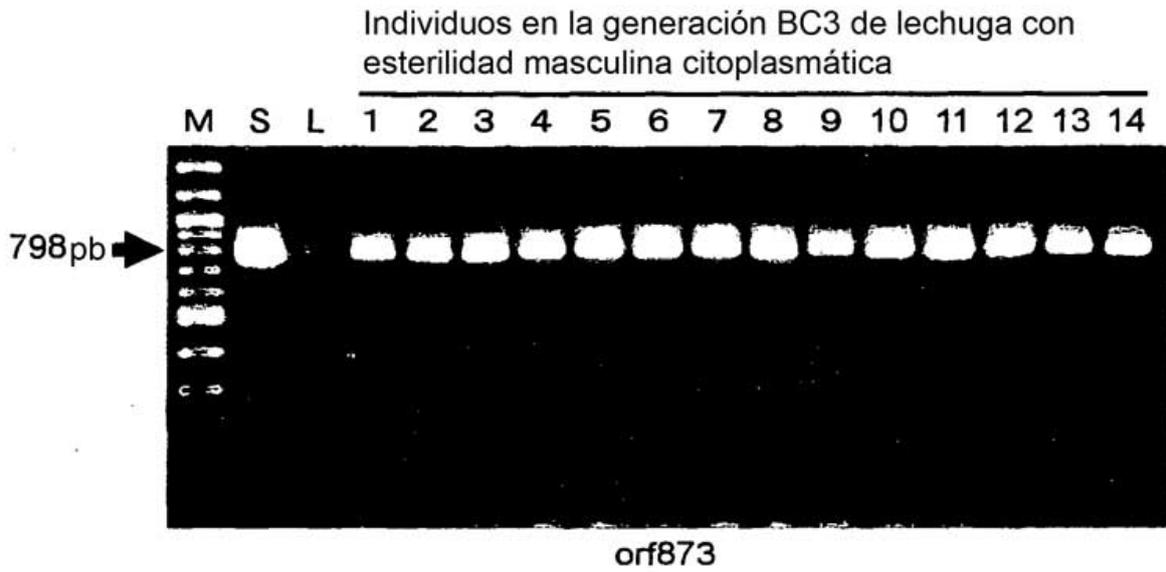
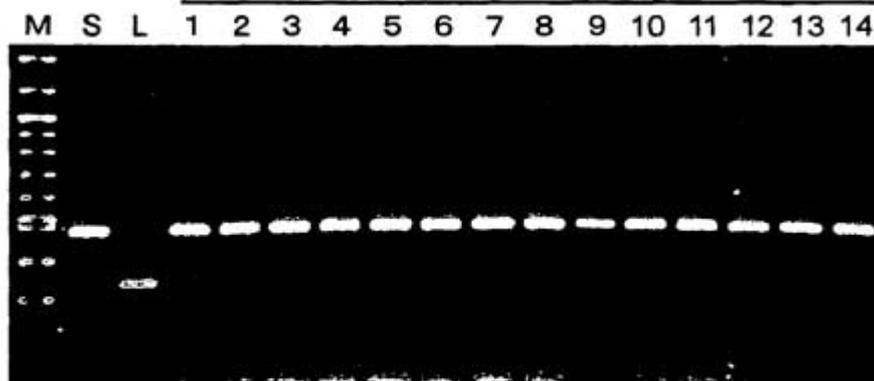


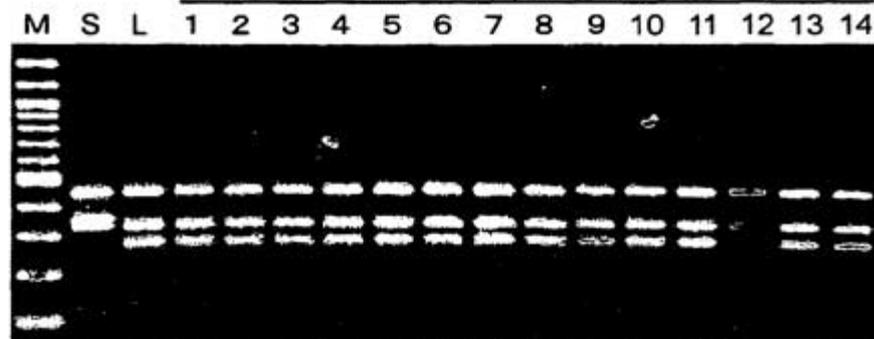
Figura 9A

Individuos en la generación BC3 de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática



atp6 / Hap II

Individuos en la generación BC3 de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática



cox II / Hap II

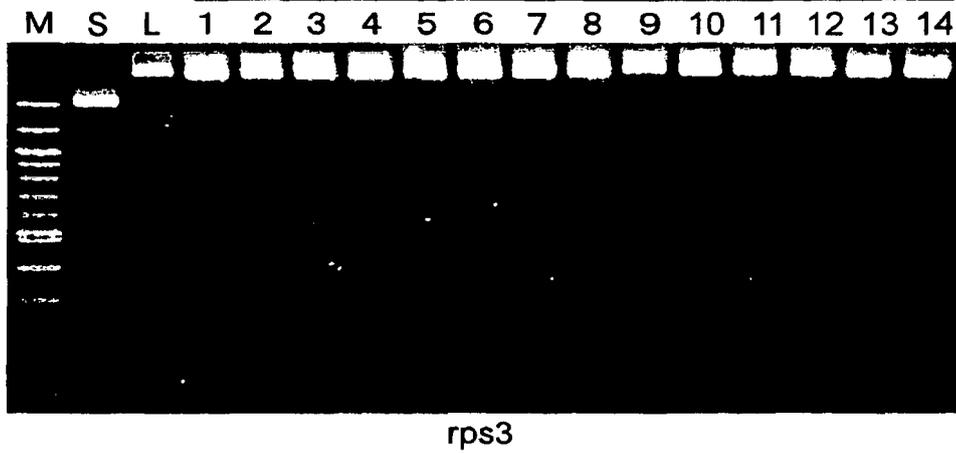
Individuos en la generación BC3 de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática



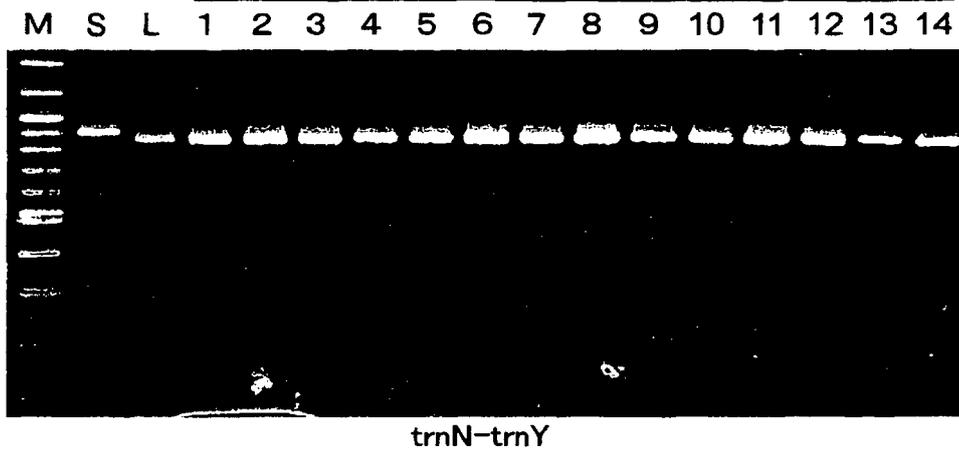
cob / Tas I

Figura 9B

Individuos en la generación BC3 de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática



Individuos en la generación BC3 de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática



Individuos en la generación BC3 de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática



Figura 10

Individuos en la generación BC3 de lechuga con esterilidad masculina citoplasmática

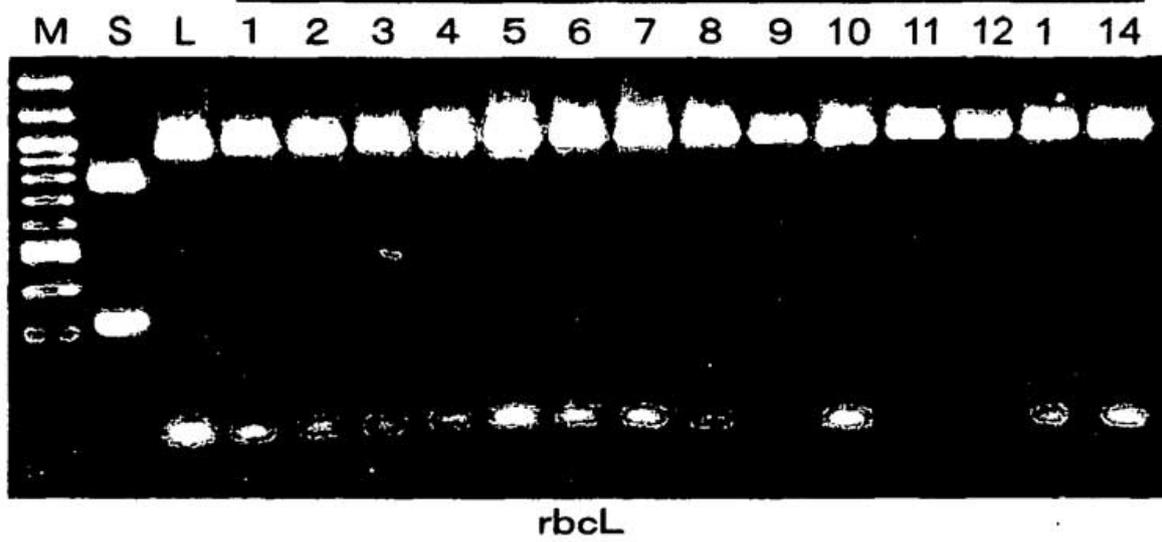


Figura 11

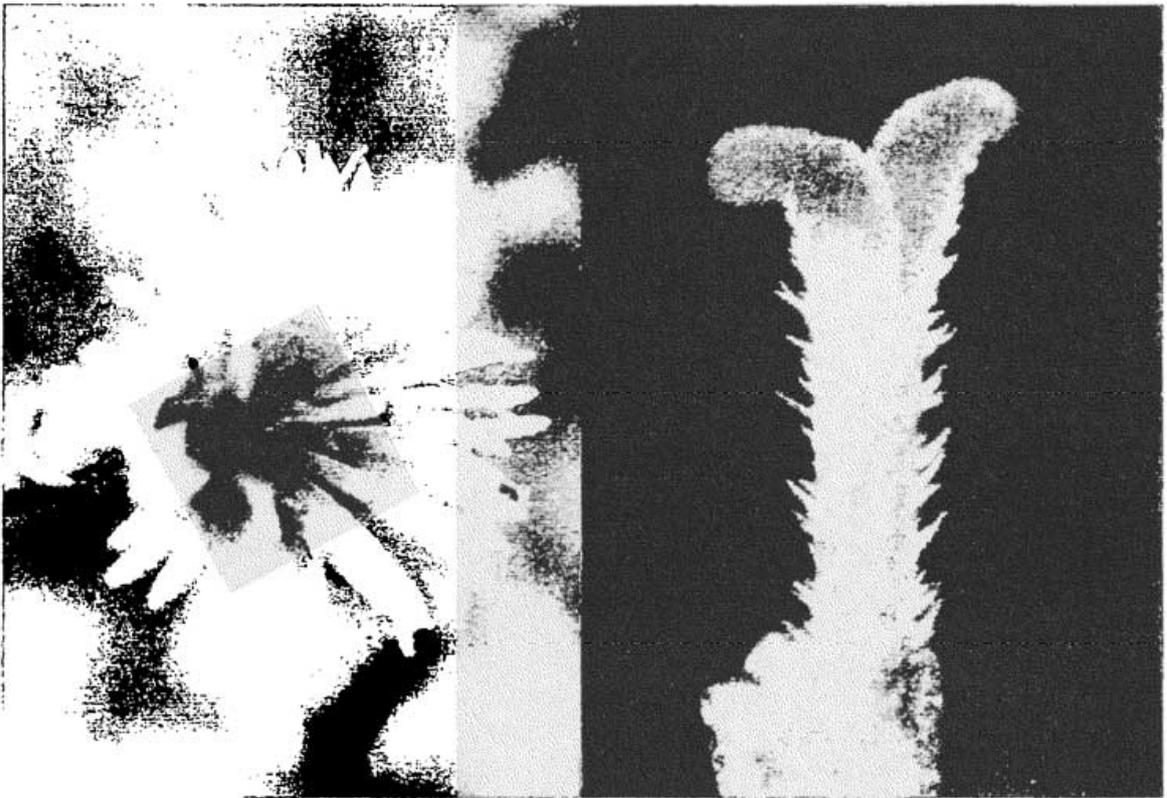


Figura 12

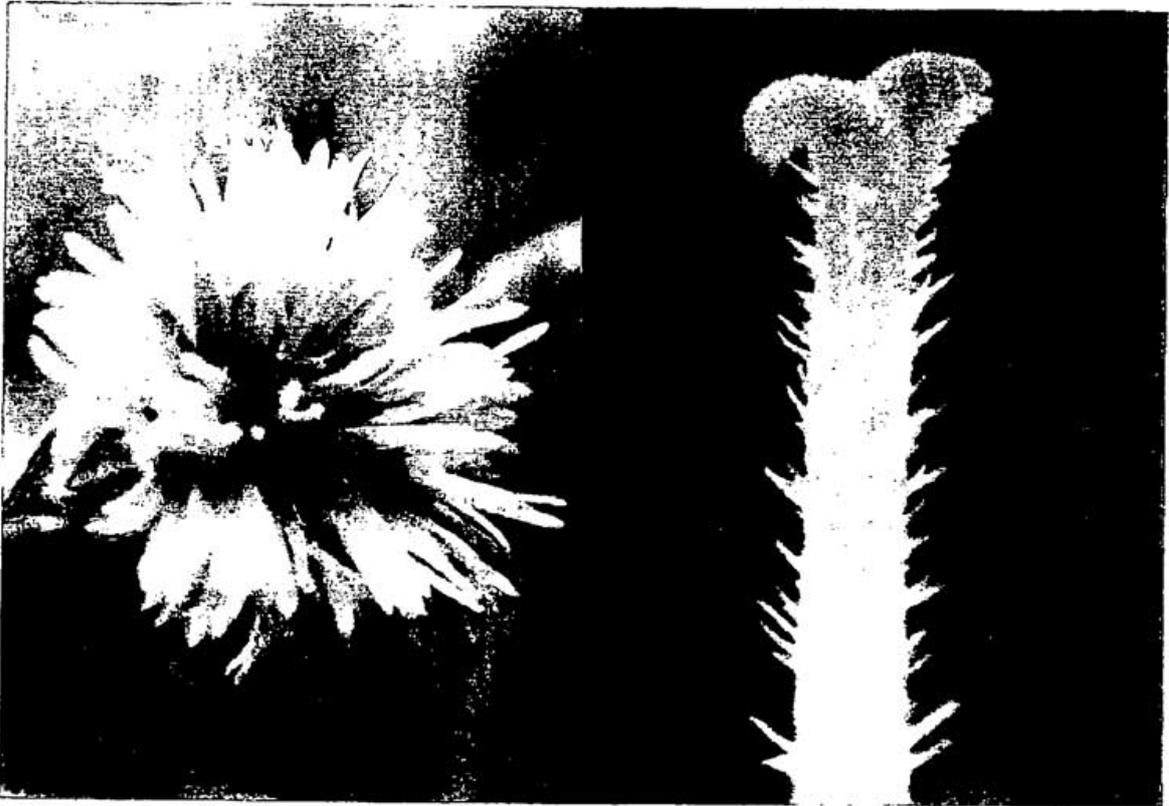


Figura 13

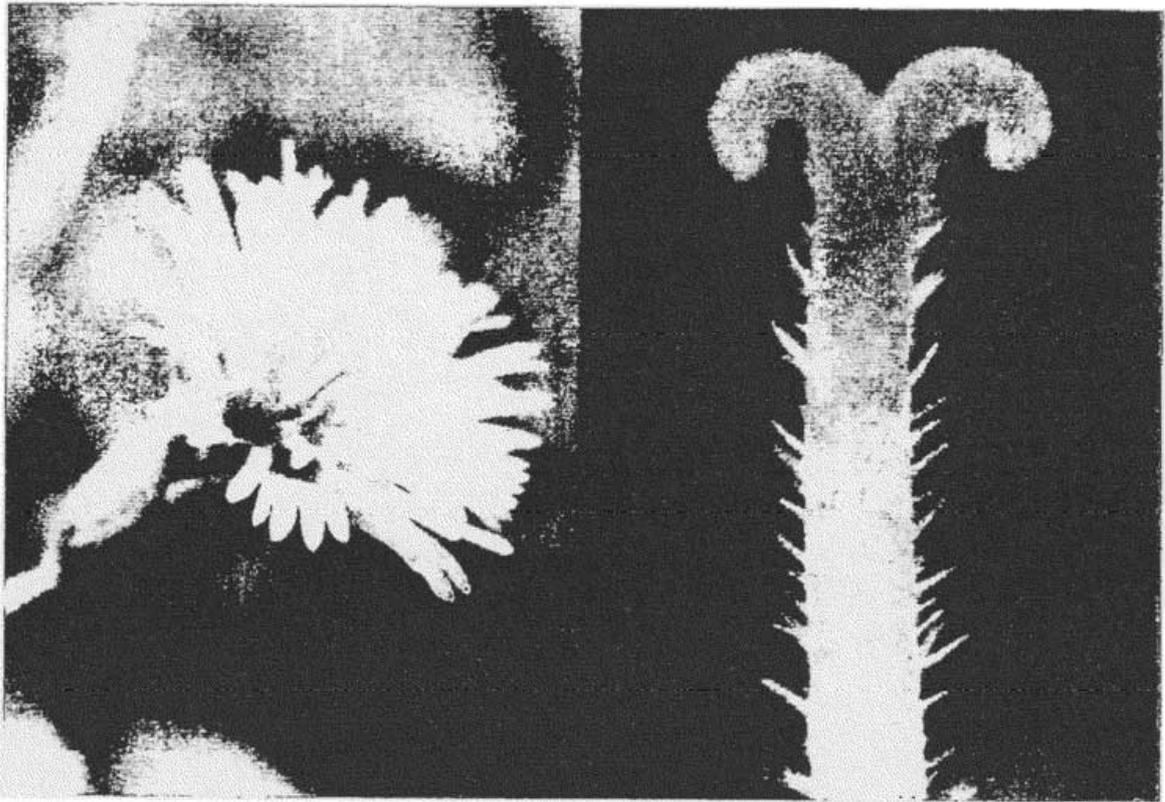


Figura 14

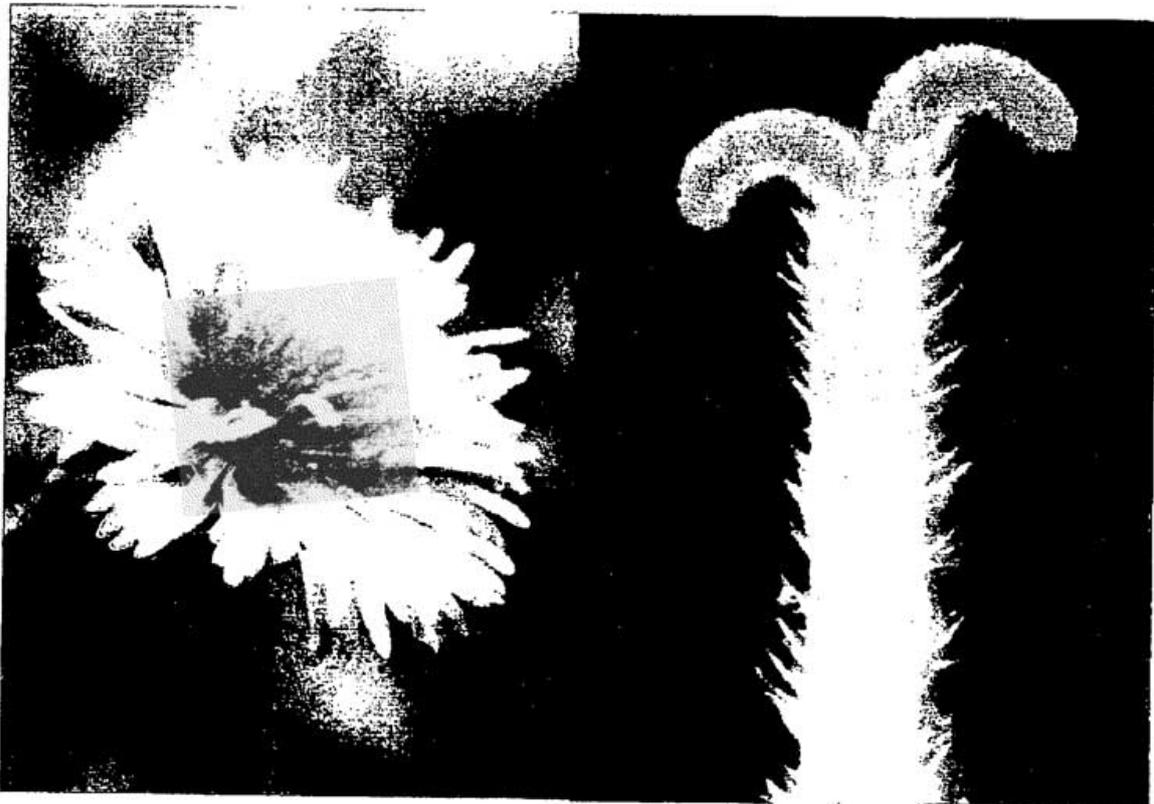


Figura 15

