

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 393**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2005 E 05821586 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 1819217**

54 Título: **Resistencia al mildiú vellosa de la cebolla que provoca el hongo Peronospora destructor**

30 Prioridad:

08.12.2004 EP 04078320

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

31.05.2016

73 Titular/es:

**HAZERA SEEDS B.V. (100.0%)
Schanseind 27
4921 PM Made, NL**

72 Inventor/es:

**HARREWIJN, JAN LEENDERT y
HOOGENBOOM, JOANNES PETRUS HUBERTUS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 572 393 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

Resistencia al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor*

5 La presente invención se refiere a plantas del género *Allium* que son resistentes al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor* (Pd) (Berk.) Cas., específicamente plantas de la especie *Allium cepa* o *Allium fistulosum*. De acuerdo con la invención, la resistencia se proporciona mediante un locus de resistencia, que puede estar presente de manera homocigota o heterocigota en el genoma de la planta, y que es suficiente para proporcionar resistencia a plantas que llevan este locus. Se divulgan procedimientos para obtener dichas plantas
10 resistentes al mildiú veloso de la cebolla, siendo adecuados dichos procedimientos para obtener cebollas y cebolletas cultivadas.

Antecedentes de la invención

15 El mildiú veloso que provoca el hongo *Peronospora destructor* (Pd) tiene una distribución prácticamente mundial. El patógeno ataca diversos tipos de cebollas, pero es especialmente destructivo para la cebolla común *Allium cepa*. El daño que provoca el hongo se describe en Mukerji (ref. 5). Si las condiciones son favorables para la enfermedad pueden producirse epidemias espontáneas en el campo. Los síntomas son amarilleo de las hojas y esporulación gris.

20 Desde un punto de vista económico, el mildiú veloso es una de las principales enfermedades fúngicas que amenazan el cultivo de cebollas y cebolletas (*Allium cepa* L.), en casi todas las regiones de cultivo de cebollas en el mundo.

25 Se supone que no está presente una resistencia natural completa al mildiú veloso en *Allium cepa* y *Allium fistulosum*. Sin embargo, se encontró una resistencia completa al mildiú veloso en el *Allium roylei* Stearn salvaje. Por lo tanto, basándose en una determinada semejanza morfológica entre *A. roylei* y *A. cepa* se ha propuesto usar *A. roylei* como una compañera de introgresión para *A. cepa*. En la publicación de van der Meer y de Vries (ref. 1) se notificaron resultados preliminares referentes a un híbrido de este tipo entre *A. roylei* y *A. cepa*, así como resultados
30 referentes al retrocruzamiento del híbrido interespecífico para *A. cepa*. Se ha observado que dicho híbrido interespecífico es fértil para machos y hembras (Kofoet *et al.*, ref. 2). También se ha notificado que puede heredarse de manera dominante una resistencia al mildiú veloso en la progenie BC1 (primer retrocruzamiento) de este híbrido para cebolla.

35 El locus en el genoma de la especie *cepa*, en donde se encuentran las secuencias de introgresión responsables de la resistencia, se ha denominado "locus de resistencia a Pd". Por extensión, "locus de resistencia a Pd" también designa las propias secuencias.

40 Sin embargo, se observa segregación para la resistencia al mildiú veloso entre las progenies BC1 y F2 procedentes de F1 entre *A. roylei* y *A. cepa* (de Vries *et al.*, ref. 3) y, más de 10 años después de que se obtuvo el primer híbrido resistente, nunca se ha obtenido ninguna variedad de cebollas para reproducción resistente al mildiú veloso.

45 Por lo tanto, existe un gran interés desde un punto de vista agronómico y económico por plantas de las especies *Allium cepa* y *Allium fistulosum*, que sean resistentes al mildiú veloso y que todavía sean 100 % resistentes tras la autopolinización, es decir que no haya segregación de la característica de resistencia. Estas plantas son particularmente valiosas ya que de hecho pueden cruzarse con una línea susceptible, proporcionando híbridos que también son resistentes al mildiú veloso de la cebolla.

50 La invención reside en primer lugar en la observación de que todo material resistente disponible de las especies *Allium cepa* y *Allium fistulosum* era de hecho heterocigota para las secuencias de resistencia a Pd y que hasta ahora no se han obtenido ni se han divulgado plantas resistentes homocigotas de manera reproducible.

55 Los presentes inventores elucidaron la razón por la que no podía obtenerse ninguna planta resistente de manera homocigota y después tuvieron éxito en obtener tales plantas de *Allium*, lo que da origen a una progenie tras autopolinización que también es el 100 % resistente (es decir, una planta resistente de manera homocigota).

60 Varias hipótesis podrían haber explicado el notable hallazgo de que no estaban disponibles plantas homocigotas: translocación, recombinación, selección por preferencia de híbridos, silenciamiento génico y efectos pleiotrópicos, arrastre genético (*linkage drag*), etcétera...

65 Los presentes inventores han determinado que el fragmento de introgresión de *Allium roylei* que está presente en el híbrido de la especie *cepa* y que confiere resistencia al mildiú veloso comprende también una secuencia designada "factor letal", cuya presencia en ambos homólogos de cromosoma en la especie *cepa* es letal para la planta. Para que exista y crezca una planta de *cepa* resistente, el fragmento de introgresión, que confiere resistencia y que contiene el factor letal, está por lo tanto necesariamente presente en un único homólogo de cromosoma, lo que explica la ausencia de plantas resistentes obtenidas de manera homocigota por los predecesores. Esta secuencia responsable de letalidad está presente en las proximidades del locus de resistencia a Pd.

Habiendo identificado que la secuencia que confiere resistencia está ligada a la secuencia letal, los presentes inventores han tenido éxito, por primera vez, en la separación física de la secuencia que confiere resistencia de la secuencia responsable de letalidad cuando están presentes en ambos cromosomas.

Esta etapa de separación, que se puede provocar mediante un acontecimiento de recombinación, es el punto clave de la presente invención. En efecto, no podría preverse que las secuencias que confieren resistencia pudieran separarse del factor letal. En primer lugar, no se sabía si dicho factor era una secuencia que en sí misma era letal o si la letalidad surgía como resultado de la sustitución, por secuencias presentes en un fragmento de introgresión, de secuencias endógenas esenciales. En efecto, es posible que la letalidad sea de hecho una inactivación del/de los gen(es) esencial(es) en el fragmento de la especie *cepa* correspondiente que no se compensan con el fragmento introducido de *A. roylei*. Por lo tanto, eran posibles distintos escenarios para explicar la letalidad:

- las secuencias de resistencia podrían haber constituido de hecho el factor letal, debido a que sustituyen secuencias endógenas críticas. Por lo tanto, nunca podrían estar presentes en ambos cromosomas sin provocar letalidad.
- las secuencias de resistencia y las secuencias letales podrían haber estado extremadamente cerca entre sí en el cromosoma, o incluso solaparse. En esta situación, la probabilidad de obtener un acontecimiento de recombinación que separe las es insignificante.
- las secuencias que constituyen el factor letal podrían haber sido necesarias para el funcionamiento de la resistencia. En esta situación, separarlas conduciría a la pérdida de la capacidad de resistencia.

En este contexto, los presentes inventores han tenido éxito inesperadamente en la separación de las secuencias que confieren el fenotipo de resistencia de la secuencia cuya presencia en ambos homólogos es letal.

Los inventores también han encontrado que la *A. cepa* resistente ya liberada posee el locus de resistencia a Pd (que es dominante) y el factor letal (que se hereda de manera recesiva) en el mismo fragmento de introgresión. Como el locus de resistencia a Pd es dominante, el fenotipo de la planta es "resistente" y no se observa el factor letal recesivo. Sin embargo, la progenie de tales plantas cuando se cruzan con plantas susceptibles se segregará y por lo tanto no puede utilizarse de manera comercial. En efecto, las cebollas y las cebolletas comerciales en general son variedades, por lo tanto material vegetal, ya sean líneas o híbridos, con un fenotipo que tiene que ser uniforme; no pueden contemplarse rasgos de interés con segregación para plantas comerciales.

Por lo tanto, la presente invención proporciona plantas de las especies *Allium cepa* y *Allium fistulosum* que son resistentes al mildiú veloso de la cebolla que provoca *Peronospora destructor* (Pd) debido a la presencia en su genoma de un locus de resistencia a Pd, y dichas plantas son plantas resistentes de manera homocigota, es decir plantas que proporcionan una progenie tras autofecundación que también es el 100 % resistente.

La presente invención también proporciona plantas resistentes que pueden obtenerse cruzando las plantas resistentes mencionadas anteriormente de las especies *Allium cepa* o *Allium fistulosum* con una planta también de las especies *Allium cepa* o *Allium fistulosum* que es susceptible al mildiú veloso.

También se divulgan procedimientos para obtener dichas plantas.

Definiciones

En el contexto de la presente solicitud, se definen los siguientes términos de la siguiente manera:

Introgresión: introducción natural de genes de una especie en otra a través del procedimiento de hibridación interespecífica seguido de retrocruzamientos sucesivos con los progenitores recurrentes. De este modo cada especie puede volverse más variable y mostrar determinados caracteres de la otra especie.

Locus de resistencia a Pd: lugar en el cromosoma que ocupan las secuencias responsables de la resistencia a *Peronospora destructor*, siendo dichas secuencias suficientes para conferir resistencia a una planta. Un locus de resistencia a Pd puede contener un gen o varios genes, posiblemente separados por secuencias o genes no relacionados. Por extensión, en el contexto de la presente invención, las propias secuencias también se denominan locus de resistencia a Pd.

Un posible locus de resistencia a Pd es el fragmento introgresión de *A. roylei* en el genoma de una planta de la línea 3591-1, número de acceso NCIMB 41249.

Susceptible/susceptibilidad: de acuerdo con la Federación Internacional de Semillas, Sección Plantas, Documento de Posición de mayo de 2004, en "Definition of the Terms Describing the Reaction of Plants to Pests or Pathogens for the Vegetable Seed Industry", la susceptibilidad es la incapacidad de una variedad de planta para limitar el crecimiento y desarrollo de una plaga o patógeno específico. Sin embargo, debe observarse que el término "susceptible" también se ha usado ampliamente en las últimas décadas para describir la misma propiedad.

Por el contrario, una planta que puede, en cierto grado y en comparación con variedades de plantas susceptibles en condiciones ambientales y presión de plagas o patógenos similares, limitar el crecimiento y el desarrollo de una plaga o un patógeno específico se califica como resistente a dicha plaga o patógeno específico. Las plantas resistentes incluyen plantas que son tolerantes, es decir permanecen infectadas pero sobreviven, y plantas que son

totalmente resistentes. A pesar de ser resistente a una plaga o un patógeno, una planta resistente atacada por dicha plaga o patógeno puede presentar síntomas característicos de las infecciones, como crecimiento reducido, muerte precoz, pérdida de las hojas...

5 Línea endogámica: línea casi homocigota (para todos los caracteres) que se produce mediante endogamia y selección continuados.

Planta resistente de manera homocigota a un patógeno: planta que proporciona una progenie tras autofecundación (autopolinización) que también es el 100 % resistente a dicho patógeno. Cuando la resistencia se debe a la presencia de una secuencia de ADN en un cromosoma de la planta, dicha secuencia está presente en todos los homólogos del cromosoma.

10 Factor letal: factor, por ejemplo un factor genético, que impide la supervivencia de una planta expuesta a este factor. La presencia de un factor letal puede evitar que la planta exista *ab initio* o puede provocar su muerte en una fase posterior.

15 *Allium cepa*: especie del género *Allium*, que comprende plantas bulbosas que tienen hojas huecas cultivadas en todo el mundo por su bulbo comestible redondeado. Las variedades de cultivo de las cebollas y cebolletas son de la especie *Allium cepa*.

Recombinación: entrecruzamiento que se produce durante la meiosis.

20 La presente invención proporciona un primer tipo de planta, es decir una planta de las especies *Allium cepa* o *Allium fistulosum* que es resistente al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor* (Pd). De acuerdo con la presente invención, la resistencia al mildiú veloso se debe a un locus de resistencia a Pd en el genoma de la planta, caracterizado porque el locus de resistencia está presente **de manera homocigota** en el genoma, es decir las secuencias responsables de la resistencia están presentes en dos copias en el genoma de una planta de acuerdo con la invención, es decir presentes en ambos homólogos cromosómicos.

25 Más específicamente, la invención se dirige a una planta de las especies *Allium cepa* o *Allium fistulosum* que es resistente al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor* (Pd) debido a un locus de resistencia a Pd presente de manera homocigota en el brazo largo del cromosoma 3 en el genoma de dicha planta, estando el locus de resistencia a Pd en un fragmento de introgresión de *Allium roylei*, en la que, al llevar a cabo el siguiente procedimiento:

30

- a. Restricción del ADN genómico de dicha planta con las enzimas de restricción PstI y MseI;
- b. Ligamiento con los siguientes adaptadores oligonucleotídicos:

35

alfa 5'- CTCGTAGACTGCGTACATGCA
CATCTGACGCATGT - 5', y
beta 5'- GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT - 5';

40 c. Amplificación selectiva de conjuntos de fragmentos de restricción, la presencia del locus de resistencia a Pd se caracteriza por

- un producto de amplificación de 61 nucleótidos cuando se utilizan los siguientes cebadores en la etapa c):

45 (A) 5' - GACTGCGTACATGCAGAAC y 5' - GATGAGTCCTGAGTAACTT, o

- un producto de amplificación de 151 nucleótidos cuando se utilizan los siguientes cebadores en la etapa c):

(B) 5' - GACTGCGTACATGCAGAAG y 5' - GATGAGTCCTGAGTAAAAC o

- 50 • un producto de amplificación de 330 nucleótidos cuando se utilizan los siguientes cebadores en la etapa c):

(C) 5' - GACTGCGTACATGCAGACA y 5' - GATGAGTCCTGAGTAAACCA.

55 En efecto, los presentes inventores han tenido éxito en la separación de las secuencias responsables de la resistencia al mildiú veloso de las secuencias letales ligadas, que los inventores identificaron que eran letales si están presentes en ambos homólogos de cromosoma. Al separar estos dos tipos de secuencias, los inventores han podido obtener así una planta homocigota para las secuencias de interés (locus de resistencia a Pd), sin ser homocigota para las secuencias perjudiciales (factor letal). La invención atañe a estas plantas viables homocigotas para las secuencias que confieren resistencia. Estas plantas no son necesariamente homocigotas para las secuencias letales, que sin embargo pueden estar presentes, pero sólo en una única copia.

60

Dado que estas plantas de acuerdo con la invención son homocigotas para las secuencias de interés que confieren resistencia, cualquier progenie de una planta de la invención conducirá a una planta también resistente al mildiú veloso, sin segregación de esta característica. En efecto, cualquier planta en la progenie tendrá en su genoma el locus de resistencia a Pd, el cual se sabe que es dominante sobre el fenotipo susceptible.

65

Se considera que una planta es resistente si puede limitar el crecimiento y el desarrollo de *Peronospora destructor*, impidiendo la infección o combatiendo el crecimiento del hongo tras la infección. Por el contrario, una planta que no puede limitar el crecimiento y el desarrollo de *Peronospora destructor* se dice que es susceptible a *Peronospora destructor*.

De acuerdo con la invención, dicha resistencia comprende la resistencia a la infección natural por *Peronospora destructor* y también la resistencia a la inoculación artificial de *Peronospora destructor*. Pueden llevarse a cabo pruebas artificiales en invernaderos o en salas climatizadas con entornos más controlados. Pueden someterse a prueba las plantas jóvenes y los bulbos germinados.

En el artículo de de Vries *et al.* (ref. 3) se notifican protocolos para someter a prueba si una planta es resistente o susceptible a *Peronospora destructor*.

También puede someterse a prueba genéticamente la resistencia con marcadores moleculares, sometiendo a ensayo la presencia del locus de resistencia a Pd en el genoma de una planta. El experto en la materia conoce bien las técnicas que pueden usarse y en general se basan en amplificación génica.

Las técnicas que pueden utilizarse para la tipificación molecular incluyen polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), electroforesis de enzimas multilocus y ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Otra técnica que es particularmente adecuada para someter a prueba la presencia del locus de resistencia a Pd en el genoma de una planta, es el AFLP™ (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados, *Amplified Fragment Length Polymorphism*); tal técnica se describe por ejemplo en Vos *et al.* (ref. 4). Esta técnica consta de una primera etapa de digestión del ADN genómico con enzimas de restricción adecuadas, de manera simultánea con el ligamiento con adaptadores oligonucleotídicos diseñados específicamente. Estos adaptadores tienen secuencias que corresponden al sitio de restricción, ligadas a una secuencia adicional definida. Después, en una segunda etapa, se lleva a cabo la amplificación por PCR de los fragmentos de restricción etiquetados obtenidos, con cebadores cuya secuencia comprende una secuencia complementaria a los adaptadores y 1, 2 o 3 nucleótidos adicionales que permiten la diferenciación entre los fragmentos de restricción etiquetados. Esta amplificación por PCR permite la detección de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

En el ejemplo 4 a continuación se proporcionan cuatro pares de cebadores específicos que proporcionan fragmentos amplificados de longitud definida, sólo cuando está presente el locus de resistencia a Pd. Si una planta genera uno o más de los fragmentos amplificados esperados, puede deducirse que esta planta posee el locus de resistencia a Pd completo y es por lo tanto resistente al mildiú veloso. El uso de marcadores moleculares es, de manera particular muy adecuado en el contexto de la presente invención.

Preferentemente, las plantas resistentes de acuerdo con la invención son resistentes a la infección por *Peronospora destructor*.

Las plantas de acuerdo con este primer tipo de acuerdo con la invención son, por ejemplo, plantas de la línea 3591-1, que se ha depositado en el NCIMB con el número de acceso 41249. En el ejemplo 1 se notifica el procedimiento mediante el cual los inventores han obtenido esta planta. La presente invención también atañe a un segundo tipo de plantas, que son plantas híbridas que poseen dicho locus de resistencia a Pd de manera heterocigota, es decir sólo en uno de los homólogos de cromosoma. De acuerdo con la invención, pueden obtenerse dichas plantas cruzando la planta homocigota mencionada anteriormente con una segunda línea parental de las especies *Allium cepa* o *Allium fistulosum*, siendo la segunda línea parental susceptible al mildiú veloso de la cebolla.

Por lo tanto, dependiendo de la especie de las plantas que se cruzan, la invención abarca híbridos entre *Allium cepa* y *Allium fistulosum*, así como plantas de la especie *Allium fistulosum* y plantas de la especie *Allium cepa*.

Debido al hecho de que el locus de resistencia a Pd está presente de manera heterocigota en el segundo tipo de plantas de la invención, el rasgo de resistencia se segrega cuando se realizan autopolinizaciones adicionales o cuando se cruzan con otras plantas.

Una planta de acuerdo con esta realización de la invención puede obtenerse cruzando una planta de la línea 3591-1 que se ha depositado en el NCIMB con el número de acceso 41249, con una línea parental de *Allium cepa* susceptible al mildiú veloso. Preferentemente esta línea parental es una línea endogámica de *Allium cepa* estéril macho citoplasmática.

Naturalmente, el segundo tipo de planta de acuerdo con la invención puede obtenerse mediante otros procedimientos. Por ejemplo, también pueden obtenerse mediante plantas autopolinizantes ya de este tipo, aunque, tal como se explicó anteriormente, la progenie de tal autopolinización no es el 100 % resistente al mildiú veloso.

De acuerdo con la presente invención, el locus de resistencia a Pd está presente en el brazo largo del cromosoma 3, de manera homocigota o heterocigota, en el genoma de plantas de acuerdo con el primer o segundo tipo de la presente invención. Las plantas de las especies *Allium cepa* y *Allium fistulosum*, tienen de hecho, $2n=16$ cromosomas que se consideran que son cromosomas homólogos (véase en particular la referencia 8).

La descripción también divulga plantas de las especies *Allium cepa* o *Allium fistulosum*, que son resistentes al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor* (Pd) debido a un locus de resistencia a Pd, en las que cualquier fragmento del cromosoma que comprende el locus de resistencia a Pd, puede estar presente de manera homocigota en la progenie sin provocar letalidad.

5 Como se mencionó anteriormente, las secuencias que provocan la letalidad pueden encontrarse generalmente en las proximidades de las secuencias o locus de resistencia a Pd. La parte del cromosoma que comprende el locus de resistencia a Pd y dichas secuencias letales pueden en general no estar presentes en ambos homólogos de cromosoma, debido a impide que la planta exista. Al separar el locus de resistencia a Pd de las secuencias letales, 10 los inventores han podido obtener plantas que contienen el locus de resistencia a Pd y en las que cualquier parte del cromosoma que comprende el locus de resistencia a Pd está o puede estar presente en ambos homólogos de cromosoma, porque no están presentes las secuencias letales.

15 Las plantas de la especie *Allium fistulosum* de acuerdo con la invención se pueden obtener cruzando una primera planta de la línea 3591-1 (depositada en el NCIMB con el número de acceso 41249) con una planta de la especie *Allium roylei* y después retrocruzando una o varias veces el híbrido obtenido con las plantas de la especie *Allium fistulosum*, es decir, utilizando *Allium roylei* como una especie "puente"

20 La descripción también divulga una planta de las especies *Allium cepa* o *Allium fistulosum*, que es resistente al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor* (Pd), en la que al menos uno de los homólogos del cromosoma 3 comprende un locus de resistencia a Pd y cualquier fragmento de dicho cromosoma, que comprende el locus de resistencia a Pd, puede estar presente de manera homocigota en la progenie sin provocar letalidad.

25 Debe indicarse que también es parte de la presente invención, una planta que es homocigota para el locus de resistencia a Pd y heterocigota para las secuencias letales, es decir las secuencias letales están presentes sólo en un homólogo del cromosoma 3. En efecto, cualquier fragmento de al menos uno del homólogo del cromosoma 3, el homólogo que comprende el locus de resistencia a Pd sin las secuencias letales, puede estar presente de manera homocigota en la progenie sin provocar letalidad.

30 Tal son, por ejemplo, las plantas 3591-3, 3591-4, 3591-5, 3591-6 o 3591-8 que se muestran a modo de ejemplo en el ejemplo 3 de la sección experimental de la presente solicitud.

35 Mediante la autopolinización de una planta resistente, puede deducirse mediante el análisis de la progenie si la planta corresponde a la definición proporcionada anteriormente. El ejemplo 5 proporciona detalles acerca del análisis que ha de llevarse a cabo para una determinación de este tipo. El principal criterio que ha de evaluarse es el porcentaje de la progenie que es resistente. Cualquier planta resistente es una planta de acuerdo con la invención si al menos el 75 % (+/- el 5 % debido a la variabilidad de las medidas) de la progenie también es resistente. La figura 1 muestra a modo de ejemplo las distintas situaciones a nivel genómico, que conducen a este porcentaje.

40 Debe indicarse que una planta que tiene una resistencia a Pd ligada a las secuencias letales sólo en un homólogo de cromosoma no es parte de la presente invención. Tal planta, tras la autopolinización, proporcionará una progenie que es, de acuerdo con la ley genética, el 66,7 % resistente, es decir menos del 75 %. Tal planta puede diferenciarse así de las plantas de acuerdo con la presente invención.

45 Tal planta, por ejemplo, es una planta de la línea 2348 que se muestra a modo de ejemplo en el ejemplo 2 de la sección experimental de la presente solicitud.

50 Preferentemente, el locus de resistencia a Pd está presente de manera homocigota en una planta de acuerdo con la invención.

55 El locus de resistencia a Pd, que confiere resistencia a la infección por *Peronospora destructor*, está presente en un fragmento de introgresión; éste se origina a partir de una planta que es resistente de manera natural al mildiú veloso de la cebolla, concretamente a partir de *Allium roylei*. La presencia de un fragmento de introgresión en el genoma de una planta de las especies *Allium cepa* o *Allium fistulosum* puede obtenerse cruzando dichas plantas con un compañero de introgresión, obteniéndose así un híbrido. Dicho híbrido preferentemente se retrocruza con una planta de las especies *Allium cepa* o *Allium fistulosum* con el fin de minimizar los fragmentos de introgresión, y después se selecciona con respecto a la capacidad de mostrar resistencia al mildiú veloso.

60 En efecto, preferentemente se limitan los fragmentos de introgresión en una planta de las especies *Allium cepa* o *Allium fistulosum* de acuerdo con la invención con el fin de tener plantas que compartan todas las características de interés de la planta parental excepto el rasgo de resistencia.

65 Preferentemente, los fragmentos de introgresión en el genoma de una planta de acuerdo con la presente invención están presentes solo en uno o en ambos homólogos del cromosoma 3 en el brazo largo del cromosoma 3. Se prefiere que el fragmento de introgresión que comprende el locus de resistencia a Pd sea menos del 50 % de la longitud del brazo largo del cromosoma 3, preferentemente menos del 44 %, más preferentemente menos del 35,

30, 25 o 20 % de la longitud del brazo largo del cromosoma 3. Como se mencionó anteriormente, el fragmento de introgresión se origina a partir del genoma de *Allium roylei*.

Las plantas de acuerdo con este tipo son plantas de la línea 3591-1 que se ha depositado en el NCIMB con el número de acceso 41249.

Debe indicarse que pueden estar presentes uno, dos o más fragmentos de introgresión, por ejemplo en el brazo largo del cromosoma 3, siendo, sin embargo, cada fragmento distinto y estando separado de los otros. Preferentemente sólo hay un fragmento de introgresión.

De acuerdo con la situación más favorable, el fragmento de introgresión presente en una planta de acuerdo con la invención es sólo las secuencias estrictamente necesarias para la resistencia al mildiú veloso.

Las plantas de acuerdo con la invención pueden utilizarse para transferir la resistencia a Pd a otras plantas de valor agronómico, siempre que las plantas puedan cruzarse entre sí. Esto puede realizarse obteniendo un híbrido y después retrocruzando el híbrido con las segundas plantas, seguido de autopolinizaciones de las plantas obtenidas; en cada etapa se selecciona la progenie resistente.

Preferentemente, las plantas de acuerdo con la invención son estables para la característica de interés, es decir resistencia al mildiú veloso de la cebolla, aunque no necesariamente para otros rasgos.

Puede obtenerse una planta de acuerdo con la presente invención a partir de un cruzamiento interespecífico inicial entre un genitor de *Allium salvaje* resistente al mildiú veloso de la cebolla y *Allium cepa*. De acuerdo con esta situación, el fragmento de introgresión se origina a partir del genitor de *Allium salvaje*.

Con el fin de obtener una planta de acuerdo con la invención, es decir de la especie *Allium cepa* o *Allium fistulosum*, debe ser necesario seleccionar plantas híbridas resultantes del cruzamiento que compartan la mayor similitud genotípica con el progenitor de la especie *Allium cepa* o *Allium fistulosum* que, sin embargo, es resistente al mildiú veloso. Preferentemente, puede obtenerse una planta de acuerdo con la invención tras el cruzamiento interespecífico inicial anteriormente mencionado seguido de varios retrocruzamientos con una planta de la especie parental y de manera opcional una o varias autopolinizaciones.

Las etapas de retrocruzamientos y autopolinizaciones permiten reducir la proporción de fragmentos de introgresión en la planta resultante. El número de retrocruzamientos que se recomienda es de al menos 2, preferentemente 3, 4, 5 o también pueden considerarse 6, 7, 8 a 10 retrocruzamientos sucesivos. El número de autopolinizaciones que se realizarán está entre 1 y 8, preferentemente 2, 3, 4 o 5.

El cruzamiento interespecífico inicial es entre el genitor de *Allium salvaje* resistente al mildiú veloso de la cebolla y *Allium cepa* y los retrocruzamientos mencionados se llevan a cabo con plantas de la especie *Allium cepa*.

El genitor de *Allium salvaje* es una planta de la especie *Allium roylei*.

Como se mencionó anteriormente, puede someterse a prueba la presencia del locus de resistencia a Pd, de acuerdo con protocolos bien conocidos, para detectar la resistencia a infecciones por *Peronospora destructor*. Sin embargo, estos protocolos requieren mucho tiempo. Por lo tanto, también puede someterse a prueba la presencia del locus de resistencia a Pd mediante otras técnicas genéticas, basadas en amplificación génica, que conoce bien el experto en la técnica.

Las técnicas que pueden utilizarse para la tipificación molecular incluyen polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), electroforesis de enzimas multilocus y ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Otra técnica que es particularmente adecuada para someter a prueba la presencia del locus de resistencia a Pd en el genoma de una planta, es el AFLP™ (Polimorfismos en Longitud de Fragmentos Amplificados); por ejemplo tal técnica se describe en la referencia 4. Esta técnica es particularmente adecuada para la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, esta técnica denominada AFLP™ se utiliza para someter la presencia del locus de resistencia a Pd en el genoma de una planta del género *Allium*. La restricción del ADN genómico de la planta preferentemente se realiza con las enzimas de restricción *PstI* y *MseI*; y el ligamiento se realiza con los siguientes adaptadores:

alfa 5' – CTCGTAGACTGCGTACATGCA
 CATCTGACGCATGT-5', y
 beta 5' – GACGATGAGTCCTGAG
 TACTCAGGACTCAT-5'.

Después se lleva a cabo la amplificación por PCR de los fragmentos de restricción ligados a los adaptadores con los siguientes cebadores:

(A) 5'-GACTGCGTACATGCAGAAC y 5'-GATGAGTCCTGAGTA ACTT.

De acuerdo con este procedimiento, la presencia de un locus de resistencia a Pd en la planta sometida a prueba puede deducirse a partir de la presencia de un fragmento amplificado de 61 nucleótidos. En efecto, si tal fragmento es resultado de las etapas precedentes, es indicativo de la presencia de un locus de resistencia a Pd de acuerdo con la invención, como puede deducirse a partir de los resultados notificados en el ejemplo 4.

Como alternativa, el método puede llevarse a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo alternativo:

- se realiza la restricción del ADN genómico de la planta con las enzimas de restricción *PstI* y *MseI*; y
- se realiza el ligamiento con los siguientes adaptadores:

alfa 5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA
CATCTGACGCATGT-5', y
beta 5'-GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT-5';

- después se lleva a cabo la amplificación por PCR de los fragmentos de restricción ligados a los adaptadores con los siguientes cebadores:

(B) 5'-GACTGCGTACATGCAGAAG y 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAC. Cuando se lleva a cabo tal protocolo, un fragmento específico de 151 nucleótidos es representativo de la presencia de un locus de resistencia a Pd en el genoma de la planta sometida a prueba, tal como puede deducirse a partir de los resultados notificados en el ejemplo 4.

De acuerdo con una tercera alternativa, el método puede llevarse a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo:

- se realiza la restricción del ADN genómico de la planta con las enzimas de restricción *PstI* y *MseI*; y
- se realiza el ligamiento con los siguientes adaptadores:

alfa 5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA
CATCTGACGCATGT-5', y
beta 5'-GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT-5';

- después se lleva a cabo la amplificación por PCR de los fragmentos de restricción ligados a los adaptadores con los siguientes cebadores:

(C) 5'-GACTGCGTACATGCAGACA y 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCA.

Cuando se lleva a cabo tal protocolo, un fragmento específico de 330 nucleótidos es indicativo de la presencia de un locus de resistencia a Pd en el genoma de la planta sometida a prueba, tal como puede deducirse a partir de los resultados notificados en el ejemplo 4.

El ejemplo 4 de la presente invención describe el uso de tal método.

La presente invención también divulga una planta de la especie *Allium cepa*, resistente de manera homocigota al mildiú veloso de la cebolla, es decir la progenie de dicha planta tras la autopolinización es el 100 % resistente al mildiú veloso, que puede obtenerse llevando a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Cruzamiento interespecífico entre *Allium roylei* y *Allium cepa*;
- b) Selección de un híbrido interespecífico, resistente al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor* (Pd);
- c) Retrocruzamiento de dicho híbrido con plantas de *Allium cepa*;
- d) Selección de plantas resistentes al mildiú veloso de la cebolla;
- e) Autopolinización de las plantas así obtenidas;
- f) Selección de plantas resistentes de manera homocigota al mildiú veloso de la cebolla.

Se ha probado que la etapa a) proporciona híbridos interespecíficos viables que son fértiles para machos y hembras. Puede hacerse el cruzamiento interespecífico entre *Allium roylei* como el parental macho y *Allium cepa* como el parental hembra o por el contrario con *Allium roylei* como el parental hembra y *Allium cepa* como el progenitor macho.

La etapa b) es una etapa de selección de plantas resistentes al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor*. Como se mencionó en los párrafos precedentes, puede someterse a prueba la resistencia mediante inoculaciones naturales o artificiales con protocolos conocidos descritos en la bibliografía o en la sección experimental de la presente solicitud. La selección también puede lograrse aprovechando el método de AFLP™

descrito anteriormente. Las enzimas, adaptadores y cebadores de PCR útiles se describieron anteriormente, junto con la longitud del fragmento amplificado esperado, indicativo de la presencia del locus de resistencia a Pd.

5 De acuerdo con la presente descripción, las plantas seleccionadas en la etapa b) no sólo son resistentes al mildiú veloso de la cebolla, sino que también comparten de manera ventajosa tantas características morfológicas como sea posible con el progenitor parental *Allium cepa*.

10 La etapa c) atañe al retrocruzamiento del híbrido interespecífico seleccionado en la etapa b) por su resistencia al mildiú veloso de la cebolla con plantas de la especie *Allium cepa*. Estas plantas de *Allium cepa* utilizadas para la etapa de retrocruzamiento pueden ser de la misma subespecie, variedad o forma que la planta utilizada en la etapa a) como progenitor para el híbrido interespecífico, pero no necesariamente.

15 Tras obtenerse las plantas resultantes del retrocruzamiento, se seleccionan las plantas que son resistentes al mildiú veloso de la cebolla. Como se mencionó para la etapa b), esta selección puede lograrse sometiendo a prueba la capacidad para resistir una infección por *Peronospora destructor*, o logrando una tipificación molecular, por ejemplo mediante la técnica de AFLP™.

20 En una realización preferente de la presente descripción, esta etapa c) seguida de la etapa d) se repiten de manera ventajosa al menos una vez, es decir, hay al menos dos retrocruzamientos sucesivos. El número de retrocruzamientos puede variar entre 2 a 10, preferentemente 3, 4, 5 o 6.

La etapa e) es una etapa de autopolinización o autofecundación, que conoce bien un experto en la materia.

25 Esta etapa de autopolinización va seguida de la selección de plantas resistentes al mildiú veloso de la cebolla, las cuales comparten todos los rasgos característicos de una planta de la especie *Allium cepa*. Preferentemente, estas etapas de autopolinización y selección se repiten al menos una vez, es decir se logran al menos dos series de autopolinización y selección. Preferentemente, estas etapas se llevan a cabo 2, 3, 4, 5 u 8 veces, es decir se repiten 1, 2, 3, 4 o 7 veces.

30 La última etapa del procedimiento atañe a la selección de una planta que es resistente de manera homocigota al mildiú veloso de la cebolla que provoca *Peronospora destructor*. Esta condición homocigota puede someterse a prueba logrando la etapa e) y comprobando que el 100 % de la progenie es resistente al mildiú veloso.

35 De acuerdo con la presente descripción, esta última etapa de selección puede lograrse preferentemente utilizando una técnica de tipificación molecular, por ejemplo la técnica de AFLP™ como se describió en las secciones precedentes y preferentemente con las enzimas de restricción, los adaptadores y los cebadores enumerados anteriormente.

40 La presente descripción también divulga un método para la producción de una planta de la especie *Allium cepa* que es resistente al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor* (Pd), que comprende las siguientes etapas:

- 45 a) Obtener una *Allium roylei* resistente al mildiú veloso de la cebolla;
 b) Hacer un cruzamiento interespecífico entre dicha *Allium roylei* y una *Allium cepa*;
 c) Seleccionar un híbrido interespecífico resistente al mildiú veloso de la cebolla;
 d) Retrocruzar dicho híbrido con una planta de *Allium cepa*;
 e) Seleccionar las plantas resistentes al mildiú veloso de la cebolla;
 f) Autopolinizar la planta resistente obtenida en la etapa e);
 g) Seleccionar las plantas resistentes de manera homocigota al mildiú veloso de la cebolla.

50 De acuerdo con la presente descripción, para seleccionar plantas resistentes al mildiú veloso de la cebolla se utilizan marcadores moleculares en las etapas c), e) y/o g).

55 Las diferentes etapas del método son tal como se explicaron en los párrafos precedentes. Las realizaciones preferentes del procedimiento también se mencionaron previamente, en particular, la repetición de las etapas d) y e) y de las etapas f) y g). Las etapas de selección también pueden lograr tal como se explicó previamente. Preferentemente se logran usando un método de tipificación molecular haciendo uso de marcadores moleculares. Un método particularmente preferido es AFLP™ que se describe en las secciones precedentes. De acuerdo con la descripción, pueden utilizarse marcadores moleculares sólo en la etapa de selección c), o sólo en la etapa e), o sólo en la etapa g), o en cada una de estas etapas, o en dos de las tres.

65 En cada etapa de selección, las plantas seleccionadas preferentemente son plantas que comparten el mayor número de rasgos característicos para *Allium cepa*. De acuerdo con este procedimiento, en cada etapa se minimizan los fragmentos de introgresión que se originan a partir del primer genitor de *Allium roylei*. Los rasgos característicos para *Allium cepa* son como se divulga en las *Guidelines for the Conducts of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability* (Directrices para llevar a cabo pruebas para determinar la distinción, uniformidad y estabilidad) (referencia TG/46/6), en relación con el tratado de la UPOV.

De acuerdo con la descripción, el método también puede comprender una etapa adicional de cruzamiento de la planta obtenida al final de la etapa g) con una planta de la especie *Allium cepa* que es susceptible al mildiú veloso de la cebolla. La planta resultante es resistente al mildiú veloso, ya que la planta obtenida al final de la etapa g) es resistente de manera homocigota al mildiú veloso.

Como ya se mencionó, la etapa de selección c), e) y/o g) puede llevarse a cabo utilizando la técnica de AFLP™. Tal como se muestra a modo de ejemplo en la presente solicitud, las enzimas de restricción utilizadas en esta técnica son preferentemente las enzimas *PstI* y *MseI*. El par de adaptadores adecuado para la etapa de ligamiento es:

alfa 5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA
 CATCTGACGCATGT-5', y
 beta 5'-GACGATGAGTCCTGAG
 TACTCAGGACTCAT-5'.

Para la etapa de amplificación por PCR, los pares adecuados de cebadores que pueden utilizarse son:

(A) 5'-GACTGCGTACATGCAGAAC y 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT;
 (B) 5'-GACTGCGTACATGCAGAAG y 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAC; y
 (C) 5'-GACTGCGTACATGCAGACA y 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCA.

Se amplifican varios fragmentos y pueden detectarse en un gel de agar tras esta amplificación por PCR. Sin embargo, la presencia de un fragmento que tiene 61 nucleótidos cuando se utiliza el par de cebadores (A), es indicativo de la presencia de un locus de resistencia a Pd en el genoma de la planta sometida a prueba. Como alternativa, cuando se utiliza el par de cebadores (B), la longitud del fragmento amplificado indicativo es de 151 nucleótidos, y de 330 cuando se utiliza el par de cebadores (C).

En una realización preferente de la invención, cuando se utiliza la técnica de AFLP™, también pueden llevarse a cabo amplificaciones por PCR adicionales, con el fin de detectar falsos positivos. De acuerdo con este procedimiento, las amplificaciones se llevan a cabo con al menos un par de cebadores elegidos entre los siguientes pares de cebadores:

(A') 5'-GACTGCGTACATGCAGAAG y 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAC;
 (B') 5'-GACTGCGTACATGCAGAAC y 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT; y
 (C') 5'-GACTGCGTACATGCAGAAA y 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC.

Los fragmentos amplificados resultantes de estas amplificaciones adicionales se utilizan como controles negativos. Cuando se utiliza el par de cebadores (A'), (B') o (C'), no debe detectarse un fragmento de la longitud esperada cuando se usa el par de cebadores (A), (B) o (C).

La presente descripción también divulga plantas del género *Allium* que pueden obtenerse mediante los métodos como se describe, en particular mediante el método de acuerdo con las realizaciones preferentes.

La invención también atañe a una planta de *Allium cepa* híbrida que puede obtenerse cruzando una línea parental de *Allium cepa* susceptible al mildiú veloso con una planta resistente de manera homocigota al mildiú veloso de la cebolla de acuerdo con la invención. Dicha planta, por ejemplo, puede obtenerse llevando a cabo el método de la invención tal como se divulga anteriormente.

La línea parental de *Allium cepa* puede ser cualquier línea de la especie *Allium cepa*, preferentemente es una línea bien descrita y conocida por sus características de interés. Por ejemplo, es una línea de variedad de cultivo conocida por su sabor, crecimiento rápido u otros rasgos agronómicos importantes.

De acuerdo con una realización preferente, la línea parental es una línea endogámica de *Allium cepa* estéril macho citoplasmática.

Cualquier planta de la invención que se ha descrito es, de acuerdo con una realización preferente de la invención, una cebolla o cebolleta cultivado.

Leyendas de las figuras

Figura 1: esta figura ilustra de manera esquemática un modo potencial de transmisión del locus de resistencia a Pd y secuencias letales para la progenie de autopolinización para 4 especies *Allium* resistentes distintas. La columna de la derecha proporciona el porcentaje de resistencia en la progenie y es indicativo de si la planta progenitora tiene al menos un homólogo del cromosoma 3 que lleva el locus de resistencia sin las secuencias letales.

Figura 2: esta figura representa los cariotipos de GISH para 14 plantas resistentes al mildiú veloso de la población 2348, que se han analizado de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 2. 2348-1, 2348-3, 2348-4, 2348-5, 2348-6, 2348-7, 2348-8, 2348-11, 2348-13, 2348-14, 2348-15, 2348-16, 2348-18 y 2348-19 son distintas plantas de la misma línea parental 2348.

Figura 3: esta figura representa los cariotipos de GISH para 6 plantas resistentes al mildiú veloso de la población 3591, que se han analizado de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 2. 3591-1 (figura 3A), 3591-3 (figura 3B), 3591-4 (figura 3C), 3591-5 (figura 3D), 3591-6 (figura 3E) y 3591-8 (figura 3F) son plantas distintas de la misma línea parental 3591.

5

Ejemplos:

Ejemplo 1: Obtención de una línea resistente de manera homocigota de *Allium cepa*.

10 *Introducción:*

El mildiú veloso en la cebolla lo provoca el hongo *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. (Mukerji, ref. 5). Es un patógeno estricto que sólo puede mantenerse sobre tejido vegetal, no sobre agar ni medios líquidos *in vitro*.

15 Pueden llevarse a cabo pruebas sobre la resistencia a la enfermedad de diversas modos, véase por ejemplo de Vries *et al.* (ref. 3). Si las condiciones son favorables para la enfermedad, pueden producirse epidemias espontáneas en el campo. Pueden llevarse a cabo pruebas artificiales en invernaderos o en salas climatizadas con entornos más controlados. Pueden someterse a prueba las plantas jóvenes y los bulbos germinados. Los síntomas son amarilleo de las hojas y esporulación gris.

20 En el programa de reproducción que siguen los inventores, se han aplicado diversos métodos durante el procedimiento de retrocruzamiento y durante el procedimiento de autofecundación con el fin de obtener líneas homocigotas.

25 Este informe describe que los experimentos que dieron como resultado la conclusión de que la resistencia no se heredó de manera tan sencilla como se esperaba: monogénica dominante, y que dio como resultado la producción de la línea 3591 de la invención, con resistencia completa al mildiú veloso.

Materiales y métodos

30 El punto de partida de este estudio es la planta denominada F₁BC₂ divulgada en de Vries *et al.* (ref. 3). Esta planta se ha obtenido mediante un primer cruzamiento interespecífico entre *Allium cepa* y *Allium roylei* (F₁), seguido de dos retrocruzamientos sucesivos con *Allium cepa* (BC₂). Los presentes inventores continuaron llevando a cabo retrocruzamientos de dicho material vegetal con sus líneas de reproducción y llevaron a cabo autofecundaciones de la generación BC₅ con el fin de obtener líneas homocigotas. S₁, S₂ y S₃ indican respectivamente que se llevaron a cabo 1, 2 o 3 etapas de autofecundación (autopolinización) sucesivas.

35 Se llevó a cabo una primera prueba de campo con las líneas F₃ (F₁BC₅S₂), obtenidas de plantas resistentes de autofecundación de distintas poblaciones F₂ (F₁BC₅S₁). Se sembraron las plantas en el campo de reproducción principal de los inventores.

40 Se pusieron en el campo los bulbos propagadores que se inocularon previamente en el invernadero (Hildebrand *et al.*, ref. 7).

45 Se preparó el inoculo suspendiendo conidiosporas en agua desmineralizada. Sobre dos capas de estopilla se lavaron con agua desmineralizada las hojas con esporas. Se diluyó la suspensión hasta 5,0 x 10⁴ esporas/ml. Se inocularon las esporas en bulbos, desde el ecuador del bulbo hasta la placa basal, con una jeringa con aguja. Se pusieron los bulbos en bolsas de plástico con cierta cantidad de papel húmedo durante 24 h a 10 °C. Después de eso, se elevó la temperatura hasta 15 °C con el fin de estimular el crecimiento del micelio. Después se plantaron los bulbos en el campo.

50 Se inició una epidemia y se contaron las plantas infectadas durante la segunda mitad de agosto. Durante la época de crecimiento y hasta la fase de la caída de las hojas y la maduración de los bulbos, se realizaron recuentos de bulbos no infectados con el fin de estimar la puntuación de resistencia y la proporción de segregación de las distintas líneas. Las plantas resistentes no muestran síntomas en absoluto. Si pudo puntuarse alguna lesión, la planta se consideró como susceptible.

55 En la segunda prueba de campo, la primera semana de abril se perforaron 353 parcelas en el campo de reproducción.

60 Se rodeó el campo con bulbos, con el fin de estimular el desarrollo de la epidemia de mildiú veloso. Se inició una fuerte infección que dio como resultado una infección del 100 % de las parcelas de control de la variedad Staccato susceptible. Se hicieron recuentos de las plantas infectadas y no infectadas. Se recogieron los bulbos de las líneas relevantes y se utilizaron para investigación adicional y la producción de semillas para el año siguiente.

65

Resultados.

- 5 La primera prueba de campo dio como resultado una fuerte infección de las plantas de cebolla. Siempre que los síntomas pudieron puntuarse de manera fiable, se hicieron recuentos de las plantas susceptibles. Algunas líneas precoces cayeron en un estadio temprano y no pudo hacerse ninguna distinción entre la muerte de las hojas y los síntomas del mildiú veloso. Para estas líneas, sólo se puntuaron las plantas susceptibles y no las resistentes, debido a que la clase resistente en estas líneas precoces contendría muchos escapes. En total había 20 líneas. Se contaron 34 líneas para las plantas susceptibles y para resistentes, y estas líneas cayeron mucho más tarde y pudo realizarse de manera fiable la puntuación de resistencia. Los datos se proporcionan en la tabla 1.
- 10 La segunda prueba de campo de nuevo proporcionó una alta infección de mildiú veloso. Las parcelas de control especiales de la variedad Staccato susceptible se infectaron al 100 %. En esta prueba de campo de 353 líneas de reproducción distintas, sólo se encontró un número que no proporcionó plantas infectadas. Esta línea de reproducción 4018282 sembrada en la parcela número 3591 proporcionó 140 plantas no infectadas. Otras 21 líneas F4 (F₁BC₅S₃), obtenidas mediante autofecundación de la misma línea F3, 3997284, mostraron segregación para la resistencia, tabla 2.

Tabla 1: Prueba de campo de mildiú vellosa n.º 1:

Línea de reproducción F3 S2	Porcentaje de resistencia	Plantas susceptibles	Plantas resistentes	Línea de reproducción F3 S2	Porcentaje de resistencia	Plantas susceptibles	Plantas resistentes
3977304	72,6	63	167	3977357	73,2	56	153
3977305	67,5	124	258	3977358	92,5	7	86
3977307	90,7	26	254	3977367	68,3	33	71
3977311	52,9	177	199	3977375	60,9	88	137
3977313	57,7	224	305	3977377	71,0	54	132
3977319	55,6	248	311	3977378	57,4	103	139
3977322	51,7	357	382	3977379	56,0	80	102
3977326	50,9	82	85	3977380	61,7	75	121
3977328	59,1	56	81	3977381	66,5	56	111
3977333	57,1	275	366	3977382	58,9	304	436
3977334	62,5	48	80	3977385	66,3	31	61
3977336	66,7	25	50	3977387	60,2	37	56
3977337	56,2	312	401	3977392	55,9	152	193
3977338	70,3	33	78	3977394	72,1	39	101
3977343	74,0	20	57	3977395	55,0	45	55
3977344	68,4	24	52	3977396	47,6	66	60
3977350	58,3	43	60	Total	60,7	3401	5243
3977351	53,1	38	43				

Tabla 2: Prueba de campo de mildiú vellosa n.º2:

Línea de reproducción S3	Porcentaje de resistencia	Plantas susceptibles	Plantas resistentes
4018268	58,3	63	88
4018269	61,5	82	131
4018270	69,2	66	148
4018272	61,7	57	92
4018273	64,5	60	109
4018274	75,1	46	139
4018275	71	67	164
4018276	68,5	78	170
4018278	63,7	85	149
4018279	56,9	97	128
4018280	66,9	46	93

Línea de reproducción F4 S3	Porcentaje de resistencia	Plantas susceptibles	Plantas resistentes
4018281	60,5	90	138
4018282	100	0	140
4018283	62,2	56	92
4018284	66,7	47	94
4018287	54,8	84	102
4018288	71,4	46	115
4018289	71,5	55	138
4018290	53,8	55	64
4018291	67,8	38	80
4018292	65,2	64	120
4018293	72,2	80	208

Discusión.

El experimento de campo n.º 1 proporcionó la primera indicación clara de que la reproducción de cebollas resistentes al mildiú veloso no era tan sencilla como se esperaba anteriormente. En caso de una resistencia heredada de manera dominante, monogénica, normalmente se esperaría encontrar al menos 1/3 de las líneas que son completamente resistentes, tras autofecundar plantas F2 resistentes. Sólo las plantas RR proporcionan una progenie completamente resistente, las plantas Rr se segregarán, y en una F2 tras selección por la resistencia, las plantas RR comprenden 1/3 de la población (en donde "R" representa el alelo que lleva el gen de resistencia dominante, "r" para el gen susceptible recesivo). Se sometieron a prueba 54 líneas y pudieron puntuarse de manera fiable 34 tanto para resistencia como para susceptibilidad, pero se segregaron las 54 líneas. Esto significa una proporción significativamente diferente de 1/3.

La proporción total de plantas resistentes con respecto a todas las líneas era inferior a la esperada (60,65 %). Si se autofecundaba una planta heterocigota, se esperaba una proporción resistente del 75 % en el caso de un único gen dominante.

Las líneas individuales, como 3977307 y 3977358, proporcionaron una proporción diferente. Esto puede estar provocado por escapes. Se han sometido a prueba líneas endogámicas obtenidas de 3977303, y todas se segregaron, con proporciones que variaban entre el 52 % y el 73 % (datos no mostrados). Las plantas que no pudieron infectarse se clasifican como resistentes, pero se escaparon en mostrar síntomas, quizá debido al deterioro precoz del follaje, baja población, lo que conduce a un microclima menos húmedo u otra enfermedad o infecciones por trips.

El experimento de campo n.º 2 dio como resultado el descubrimiento de la parcela 3591-1, que contiene la línea 4018282. Esta línea no mostró plantas susceptibles en un campo fuertemente infectado. El campo contenía 353 líneas que confirmaron la complejidad de la herencia. Por otra parte, se encontró una frecuencia mucho mayor de líneas homocigotas y no sólo la línea 4018282/3591.

De la parcela 3591 se llevaron las plantas al invernadero para llevar a cabo la investigación sobre el fragmento de introgresión de *A. roylei* (véase el ejemplo 3) y para fines de producción de semillas. Los resultados presentados en el ejemplo 3 mostraron que 3591 contenía un fragmento de introgresión más pequeño. Algunas de las plantas son heterocigotas para los fragmentos de introgresión pequeños y grandes y la planta 3591-1 era homocigota para el fragmento de introgresión pequeño.

Se ilustra la singularidad de esta línea mediante los resultados de las líneas hermanas proporcionados en la tabla 2. Todas estas líneas se han derivado de la misma línea F3 mediante autofecundación y ninguna de ellas muestra homocigosidad.

Ejemplo 2: Hibridación genómica *in situ* (GISH) con la línea de reproducción 2348, generación F₁BC₅S₃ (la línea de reproducción 2348 del número de muestra 4008191 de la parcela 2348 proporcionó una resistencia del 66 % en el campo).

Khrustaleva y Kik (ref. 9 y 10) desarrollaron la técnica de hibridación genómica *in situ* (GISH) en cebolla y se ha usado en la presente invención con el fin de distinguir los insertos/segmentos genómicos de *Allium roylei* de los cromosomas de *Allium cepa*. Por lo tanto, esta técnica permite la visualización de los fragmentos de introgresión de *Allium roylei* en el genoma de una planta de *Allium cepa*.

Plant Research International BV, Wageningen (PB) llevó a cabo un primer conjunto de experimentos, con plantas de cebolla resistentes, sin embargo plantas de cebolla con segregación que corresponden a 14 plantas F₁BC₅S₃, en las que F₁ es el híbrido interespecífico entre *Allium roylei* y *Allium cepa*, BC₅ indica 5 retrocruzamientos sucesivos y S₃ 3 autopolinizaciones sucesivas.

Introducción:

La GISH es una técnica poderosa para la detección de la introgresión de material de cromatina de una especie en otras especies. La ventaja de la GISH es que el procedimiento de introgresión se visualiza por medio de "imágenes del genoma con introgresión". Con esta técnica, también es posible establecer si una región particular del genoma es homocigota o heterocigota, gracias al uso de marcadores citogenéticos moleculares que son codominantes. Mediante esta técnica, también es posible determinar en qué cromosoma está presente un gen de introgresión de interés.

Material vegetal:

El material de partida es la línea de reproducción 2348, generación F₁BC₅S₃. Se recolectan puntas de raíces jóvenes y se preparan hasta 100 portaobjetos para el análisis de propagación de metafase (para la descripción del método, véase Khrustaleva y Kik, (ref. 9 y 10)). Los portaobjetos con metafases bien propagadas y que contienen un conjunto completo de cromosomas (2n=2x=16) se seleccionan para experimentos de GISH.

Método:

Se extrae el ADN genómico de hojas jóvenes de *A. cepa* y *A. roylei* usando el método CTAB de Rogers y Bendich (ref. 13).

Se marca el ADN genómico de *A. roylei* con Dig-11-dUTP (digoxigenina-11-2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato) mediante un protocolo de marcado por relleno convencional (Boehringer, Mannheim, Alemania). Se utiliza el ADN genómico de *A. cepa* como ADN de bloqueo. La hibridación *in situ*, la detección inmunitaria y el procedimiento de microscopía son como describieron anteriormente Khrustaleva y Kik, (ref. 9 y 10). Se llevan a cabo los análisis de cariotipo de acuerdo con el sistema de nomenclatura para la cebolla convencional propuesto por Kalkman (ref. 12) y confirmado por el Cuarto Simposio de *Eucarpia Allium* por de Vries (ref. 8). Las mediciones cromosómicas de 3-5 metafases por cada registro se realizan con un programa de programa informático libre para Windows de la Universidad del Estado de Colorado: (<http://www.colostate.edu/Depts/biolog/MicroMeasure>)

Resultados:

El análisis de GISH de 14 plantas resistentes de la línea de reproducción 2348, generación F₁BC₅S₃ mostró que todas las plantas poseen el segmento de *A. roylei* que alberga el/los gen(es) para la resistencia al mildiú veloso (figuras 2A, 2B y 2C). El análisis de cariotipo reveló que el cromosoma recombinante que portaba el segmento de *A. roylei* es el cromosoma 3 (índice de centrómero: 41,7; longitud cromosómica relativa: 13,8). Trece plantas poseían sólo un segmento de *A. roylei* en el cromosoma 3, los demás cromosomas homólogos demostraron estar compuestos sólo por cromatina de *A. cepa*. Sin lugar a dudas, estos resultados demostraron que las 13 plantas de la línea de reproducción 2348 son heterocigotas para el segmento que contiene el/los gen(es) de resistencia al mildiú veloso. El registro 2348-5 posee dos segmentos de *A. roylei*: uno en el brazo largo del cromosoma 3 que portaba el/los gen(es) de resistencia al mildiú veloso y uno adicional en el brazo largo del cromosoma 4 (índice centromérico: 39,3; longitud cromosómica relativa: 12,6). Ambos segmentos están presentes de manera heterocigota en el genoma.

El análisis de GISH también permite la determinación del tamaño del segmento de introgresión en el brazo largo del cromosoma 3 de *A. roylei* dentro del cromosoma de *A. cepa*. El segmento en promedio es el 25,2 % de la longitud entera del cromosoma y el 43,9 % de la longitud del brazo largo.

Discusión:

Mediante este método, se ha detectado con éxito la introgresión de material de cromatina de *A. roylei* que porta genes de resistencia al mildiú veloso dentro del genoma de la cebolla. Los presentes datos prueban la naturaleza heterocigota de el/los gen(es) de resistencia al mildiú veloso en la línea de reproducción 2348, generación F₁BC₅S₃. En los 14 individuos seleccionados como resistentes en el campo, se encontró un segmento de *A. roylei* sólo en un homólogo del cromosoma 3. Podrían explicarse los resultados mencionados anteriormente planteando la hipótesis de que un gen (o factor de letalidad) que es necesario para el desarrollo de *A. cepa*, por ejemplo para el desarrollo de las semillas, y ubicado cerca del/de los gen(es) de resistencia al mildiú veloso, es responsable de la ausencia de plantas homocigotas. En efecto, puede suponerse que la sustitución de un gen de *A. cepa* esencial por el gen de *A. roylei* correspondiente durante la introgresión conduce a una grave alteración del desarrollo de la planta, por ejemplo el desarrollo de las semillas, cuando se coloca en un fondo citoplasmático de *A. cepa*. Puede obtenerse una cebolla resistente homocigota viable sólo si se produce la recombinación entre el/los gen(es) de resistencia al mildiú veloso y el factor de letalidad, si esto es posible.

Durante el retrocruzamiento a *A. cepa* y la selección por la resistencia al mildiú veloso, se mantendrán sólo aquellas plantas que contienen el segmento de *A. roylei* que alberga el/los gen(es) de resistencia al mildiú veloso. Eventualmente, esto conduce a plantas que consisten sólo en cromatina de *A. cepa* y un segmento de *A. roylei*. Sin embargo, de acuerdo con la hipótesis mencionada anteriormente, este segmento ha sustituido al gen de *A. cepa* necesario para el desarrollo. En un estado heterocigota, se desarrollan semillas y se obtendrán plantas, pero en el estado homocigota no se forman plantas.

Ejemplo 3: Hibridación genómica *in situ* con la línea de reproducción 3591, generación F₁BC₅S₃

Introducción:

Después del análisis de 14 plantas resistentes al mildiú veloso de la línea de reproducción 2348, generación F₁BC₅S₃, se demostró que todas las plantas eran heterocigotas para el locus de resistencia a Pd. Se detectó el segmento de *A. roylei* que alberga el/los gen(es) para resistencia al mildiú veloso sólo en uno de los homólogos del cromosoma 3, consistiendo el otro homólogo en su totalidad en cromatina de *A. cepa*. Este análisis adicional atañe a la línea de reproducción 3591 en la que no tiene lugar segregación para la resistencia al mildiú veloso en los campos. En vista de esto, se espera encontrar en esta población, a través de la GISH, plantas que son homocigotas para el área del cromosoma 3 que alberga el locus de resistencia al mildiú veloso.

Material vegetal:

Se recolectan puntas de raíces jóvenes de 6 plantas individuales, línea de reproducción 3591, generación F₁BC₅S₃, y se preparan hasta 50 portaobjetos para el análisis de propagación de metafase (para la descripción del método, véase Khrustaleva y Kik, ref. 9). Para experimentos de GISH se seleccionan los portaobjetos con metafases bien propagadas y que contienen un conjunto completo de cromosomas (2n=2x=16).

Métodos:

Se facilitan detalles en la sección "método" del ejemplo anterior.

Resultados:

Plant Research International BV, Wageningen, PB llevó a cabo los análisis de GISH de 6 plantas resistentes de la línea de reproducción 3591, generación F₁BC₅S₃ que mostraron que todas las plantas son *A. roylei* homocigota para el área que alberga el locus de resistencia al mildiú veloso (véanse las figuras 3A a 3F). El análisis de cariotipo revela la presencia de un segmento de *A. roylei* en los dos homólogos del cromosoma 3 (índice de centrómero: 41,7; longitud cromosómica relativa: 13,8). Entre las 6 plantas analizadas, el registro 3591-1 posee 2 segmentos pequeños en los dos homólogos del cromosoma 3 (figura 3A). El tamaño de los segmentos de introgresión de *A. roylei* es el mismo en los dos homólogos y promedia: el 17,9 ± 0,78 % de la longitud del brazo largo. Cinco plantas, concretamente los números de registro 3591-3, 3591-4, 3591-5, 3591-6 y 3591-8, poseen dos segmentos de introgresión de *A. roylei* que diferían en tamaño (figuras 3B, 3C, 3D, 3E y 3F). El tamaño del segmento más grande promedia el 42,8 ± 1,09 % de la longitud del brazo largo y el tamaño del más pequeño promedia el 17,9 ± 0,78 %.

Discusión:

Los presentes resultados confirman la hipótesis expuesta para explicar la naturaleza heterocigota del locus de resistencia al mildiú veloso en la línea de reproducción 2348. En efecto, puede plantearse la hipótesis de que un factor de letalidad, perjudicial para el desarrollo de la planta y que está ubicado cerca del/de los gen(es) de resistencia al mildiú veloso, es responsable de la ausencia de las plantas resistentes homocigotas, o puede plantearse la hipótesis de que un gen de *A. cepa* esencial, necesario para el desarrollo de la planta, se desactiva mediante la introgresión y es responsable de la ausencia de plantas resistentes homocigotas.

Se supone que el segmento de introgresión de *A. roylei* también posee el gen correspondiente que no funciona en un citoplasma de *A. cepa* exclusivo (es decir interacción núcleo-citoplasmática). En un estado homocigota de *A. roylei*, el gen de *A. cepa* esencial se sustituirá completamente por el gen de *A. roylei* correspondiente, en consecuencia proporcionará semillas no viables. Sólo si se produce la recombinación entre el/los gen(es) de resistencia al mildiú veloso y el gen esencial (o factor de letalidad), se obtendrá una planta resistente homocigota viable. El análisis de GISH de la línea de reproducción 3591 prueba que puede obtenerse una planta resistente homocigota (3591-1) debido a un acontecimiento de recombinación entre el gen de resistencia y el factor de letalidad. Los otros cinco registros poseen los segmentos de introgresión de *A. roylei* pequeño y grande, lo que significa que estas plantas son homocigotas para el/los gen(es) de resistencia y heterocigotas para el factor de letalidad de *A. roylei*.

Debe indicarse que, tal como se esperaba a partir de la hipótesis mencionada anteriormente, no se han encontrado plantas que posean dos segmentos de introgresión de *A. roylei* grandes, debido a que esta constitución genética da como resultado que no se desarrollen semillas.

Ejemplo 4: Identificación de marcadores ligados al locus de resistencia a *Peronospora destructor* (obtenido de *A. roylei*).

Material vegetal (número de individuos):

- 1X *Allium roylei* (resistente homocigota)
- 4x (denominados AcA a AcD) y 24X (denominados Ac01 a Ac24) *Allium cepa* (susceptible homocigota)
- 1X 3591-1 (resistente homocigota; fragmentos de introgresión pequeños)
- 1X 3591-3 (resistente homocigota, fragmentos de introgresión pequeños y grandes)
- 14X 2348-* (resistente heterocigota; fragmento grande).

Introducción:

Para información complementaria sobre la técnica de AFLP™, se hace referencia a la publicación mencionada como n.º 4.

El objetivo de este ejemplo es identificar marcadores de AFLP™ ligados al locus de resistencia a *Peronospora destructor* en cebolla. El locus de resistencia se obtiene de *Allium roylei*.

Tal como se muestra en el ejemplo 2, se ha identificado un fragmento de introgresión grande en algunos individuos (individuos 2348-*). Además de estos individuos, también se obtuvieron dos individuos que poseen un fragmento de introgresión más pequeño (3591-1; fragmento pequeño, y 3591-3; fragmentos pequeños y grandes). Para identificar los marcadores asociados con el locus de resistencia, y de manera especial obtener marcadores que están ubicados en el fragmento de introgresión más pequeño, se llevó a cabo una estrategia de Análisis de Segregantes Agrupados (BSA, véase Michelmores, ref. 11) adaptado con cuatro individuos/grupos:

- I: individuo 2348-6; resistente heterocigota; fragmento de introgresión grande,
- II: individuo 3591-1; resistente homocigota; fragmento de introgresión pequeño,
- III: individuo *Allium roylei*; resistente homocigota,
- IV: un grupo de cuatro individuos de *A. cepa* (AcA a AcD); susceptible homocigota.

Para la verificación de los marcadores ligados se utilizaron los cuatro individuos de *Allium cepa* separados, 13 individuos "2348" restantes y el individuo 3591-3. Finalmente, los marcadores que se encontró que estaban ligados al rasgo de interés se comprueban con un conjunto de 24 individuos de *Allium cepa* (Ac01 a Ac24) para identificar marcadores falsos positivos.

Resultados:

Material biológico: se extrajo ADN de material foliar de 31 individuos (28X *Allium cepa* e individuos 3591-1, 3591-3 y *Allium roylei*) y ADN de los 14x individuos "2348" y se generaron para todos los individuos moldes de *PstI/MseI*. No pudieron generarse identificaciones genéticas de AFLP™ fiables para los individuos 2348-4, 2348-5, 2348-11 y 3591-3, por lo tanto estos individuos se excluyeron del análisis adicional.

Identificación y verificación de marcadores:

Se llevó a cabo un enfoque de BSA adaptado sobre cuatro individuos o el grupo I, II, III, IV, como se describió anteriormente.

Se llevó a cabo el BSA utilizando 96 combinaciones de cebadores en la matriz de *PstI+3/MseI+3*, en la tabla 3 se proporciona una visión de conjunto de las combinaciones de cebadores utilizadas y la tabla 6 proporciona la nomenclatura de combinaciones de enzimas-cebadores de AFLP™.

El BSA dio como resultado las identificaciones de 34 marcadores candidatos, de los que ocho marcadores candidatos están posiblemente ligados al fragmento de introgresión pequeño. A partir de estos 34 marcadores candidatos, se hizo una selección de 13 marcadores que incluyen los ocho marcadores que están posiblemente ligados al fragmento de introgresión pequeño. Se utilizó esta selección de 13 marcadores para la verificación sobre más individuos. Se utilizaron para la verificación cuatro individuos de *Allium cepa*, los 13 individuos "2348" restantes y el individuo 3591-3.

Tabla 3: Combinación de cebadores usada para el enfoque de BSA

	M32	M34	M35	M37	M47	M48	M50	M51	M54	M59	M60	M62
P31	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P32					X	X	X	X	X	X	X	X
P33	X	X	X	X								
P38					X	X	X	X	X	X	X	X
P39	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P35	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P42					X	X	X	X	X	X	X	X
P43	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P44					X	X	X	X	X	X	X	X
P45	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Basándose en la verificación, tres marcadores candidatos (de los que dos están posiblemente ligados al fragmento de introgresión pequeño) no mostraron un ligamiento claro con el rasgo de interés. Sin embargo un total de cuatro, respectivamente seis marcadores candidatos, mostraron un ligamiento claro con el fragmento de introgresión pequeño, respectivamente grande. Sin embargo, dos de estos marcadores candidatos ligados al fragmento de introgresión pequeño también están presentes en uno de los cuatro individuos de *Allium cepa*. Por lo tanto, se

encuentra que estos marcadores no son útiles para el análisis adicional. Los resultados de la verificación se muestran en la Tabla 4.

5 Se encontró que los marcadores P32/M62-061, P33/M32-151, P35/M51-330 y P43/M35-190 están ligados al fragmento de introgresión pequeño.

Verificación extra en 24 individuos de *Allium cepa*:

10 Para superar los marcadores positivos falsos, se comprobaron los cuatro marcadores candidatos (P32/M62-061, P33/M32-151, P35/M51-330 y P43/M35-190) ligados al fragmento de introgresión pequeño, en 24 individuos de *Allium cepa* extra (Ac01 a Ac24). Las puntuaciones de los marcadores obtenidas concuerdan con la puntuación esperada (véase la tabla 5).

Tabla 4: Visión de conjunto de las puntuaciones de los marcadores en plantas individuales

	Marcadores ligados al fragmento de introgresión grande				Marcadores ligados al fragmento de introgresión pequeño					
	P31/M48-186	P32/M62-322	P32/M62-079	P33/M32-115	P33/M32-155	P45/M35-062	P32/M62-061	P33/M32-151	P35/M51-330	P43/M35-190
2348-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2348-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2348-4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2348-5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2348-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2348-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2348-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2348-11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2348-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2348-14	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+
2348-15	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+
2348-16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2348-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2348-19	-	+	+	+	+	x	+	-	+	+
3591-3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3591-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>A. roylei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. cepa A</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. cepa B</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. cepa C</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. cepa D</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

15 + = fragmento de AFLP™ presente, - = fragmento de AFLP™ ausente,
x = producto generado que no es bueno, ? = no puede puntuarse

20 Discusión y conclusión:

25 Para identificar los marcadores asociados con el locus de resistencia a *Peronospora destructor* en cebolla, y en especial para obtener marcadores que están ubicados en el fragmento de introgresión más pequeño, se llevó a cabo una estrategia de Análisis de Segregantes Agrupados (BSA) adaptado en cuatro individuos/grupos. Se llevó a cabo el BSA utilizando un total de 96 combinaciones de cebadores de *PstI/MseI* (que se exploraron con cuatro individuos/grupos).

Tabla 5: Visión de conjunto de las puntuaciones de los marcadores en plantas individuales

	Marcadores ligados al frag- mento de introgresión grande				Marcadores ligados al fragmento de introgresión pequeño					
	P31/M48-186	P32/M62-322	P32/M62-079	P33/M32-115	P33/M32-155	P45/M35-062	P32/M62-061	P33/M32-151	P35/M51-330	P43/M35-190
A. cepa 1						
A. cepa 2						
A. cepa 3						
A. cepa 4						
A. cepa 5						
A. cepa 6						
A. cepa 7						
A. cepa 8						
A. cepa 9						
A. cepa 10						
A. cepa 11						
A. cepa 12						
A. cepa 13						
A. cepa 14						
A. cepa 15						
A. cepa 16						
A. cepa 17						
A. cepa 18						
A. cepa 19						
A. cepa 20						
A. cepa 21						
A. cepa 22						
A. cepa 23							x	.	x	.
A. cepa 24						

+ = fragmento de AFLP™ presente, - = fragmento de AFLP™ ausente,
x = producto generado que no es bueno, ? = no puede puntuarse

5

El BSA dio como resultado la identificación de 34 marcadores candidatos de los que 8 marcadores candidatos estaban posiblemente situados en el fragmento de introgresión pequeño. Tras la verificación, se identificaron un total de cuatro marcadores que están ubicados en el fragmento de introgresión pequeño (en el que también está ubicado el locus de resistencia a *Peronospora destructor*).

10

Para superar marcadores positivos falsos, se comprobaron los cuatro marcadores candidatos (P32/M62-061, P33/M32-151, P35/M51-330 y P43/M35-190) ligados al fragmento de introgresión pequeño, en 24 individuos de *Allium cepa* extra. Las puntuaciones de los marcadores obtenidas concuerdan con la puntuación esperada. Por lo tanto, se encuentra que estos marcadores están ligados al fragmento de introgresión pequeño de interés y pueden utilizarse para procedimientos de selección adicionales.

15

Tabla 6: Nomenclatura de combinación de enzimas-cebadores de AFLP™

extensión	código de cebador	extensión	código de cebador	extensión	código de cebador
AAA	31	CCC	52	GGG	73
AAC	32	CCG	53	GGT	74
AAG	33	CCT	54	GTA	75
AAT	34	CGA	55	GTC	76
ACA	35	CGC	56	GTG	77
ACC	36	CGG	57	GTT	78
ACG	37	CGT	58	TAA	79
ACT	38	CTA	59	TAC	80
AGA	39	CTC	60	TAG	81
AGC	40	CTG	61	TAT	82
AGG	41	CTT	62	TCA	83

extensión	código de cebador	extensión	código de cebador	extensión	código de cebador
AGT	42	GAA	63	TCC	84
ATA	43	GAC	64	TCG	85
ATC	44	GAG	65	TCT	86
ATG	45	GAT	66	TGA	87
ATT	46	GCA	67	TGC	88
CAA	47	GCC	68	TGG	89
CAC	48	GCG	69	TGT	90
CAG	49	GCT	70	TTA	91
CAT	50	GGA	71	TTC	92
CCA	51	GGC	72	TTG	93
		GGG	73	TTT	94

Ejemplo 5: determinación de la presencia, en una planta del género *Allium*, de un fragmento de introgresión de *A. roylei* que confiere resistencia al mildiú veloso de la cebolla, que puede estar presente de manera homocigota sin provocar letalidad.

5 En una primera etapa, se evalúa la presencia del locus de resistencia a Pd para mildiú veloso de la cebolla en la planta examinada. Puede evaluarse la presencia de dicho locus usando la técnica de AFLP™, como se describió a modo de ejemplo en el ejemplo precedente o evaluando la resistencia de la planta a inoculaciones naturales o artificiales con *Peronospora destructor*.

10 Si la planta posee en su genoma un locus de resistencia a Pd, los homólogos del cromosoma 3 de dicha planta corresponden de manera necesaria a una de las 4 posibilidades representadas en la figura 1 (con y sin ligamiento a secuencias letales).

15 Con el fin de distinguir los tres primeros genomas del cuarto, se lleva a cabo la autopolinización de la planta examinada. Después se examina la progenie de la autopolinización para determinar la presencia del locus de resistencia a Pd. Como puede observarse a partir de la figura 1, sólo los tres primeros genomas proporcionan una progenie que es teóricamente al menos el 75 % resistente, mientras que el cuarto genoma representado, que no es parte de la presente invención, proporciona una progenie que es de menos del 67 % resistente al mildiú veloso de la cebolla.

20 Conociendo el porcentaje de la progenie resistente tras la autopolinización, es posible por lo tanto deducir si la planta sometida a prueba está en una de las tres primeras categorías representadas o está en la cuarta.

25 Ejemplo 6:

Se cruzan plantas de la línea 3591, similares a 3591-1 en el aspecto que son todas resistentes homocigotas, y que tienen dos fragmentos de introgresión pequeños que llevan el locus de resistencia, con un híbrido en un esquema de reproducción de tres vías (en el que el cruzamiento de tres vías tiene un cruzamiento único como el progenitor hembra y las plantas de la línea 3591 como el parental macho).

35 El híbrido resultante de este cruzamiento, 37-1001 se ha sometido a experimentos en los campos. Este híbrido es un tipo de cebolla semitemprana de día extremadamente largo, adecuado para el almacenamiento semiprolongado. Muestra un vigor foliar medio-fuerte, una caída muy uniforme, bulbos redondos, redondos-planas uniformes (3,8 unidades/he.), un buen potencial de rendimiento, buenas pieles con color marrón amarillento, una buena firmeza (3,4 mm). En la tabla 7 se muestran los datos de la prueba de campo, que comparan a 37-1001 con Tasco y Drago, dos híbridos de cebolla que comercializa Nickerson Zwaan. Como se puede ver en esta tabla, las características de interés agronómico son similares en todas las plantas.

40 Más importante para la presente invención, en las pruebas de campo de enfermedad mantenidas durante dos años de manera consecutiva en 2 replicaciones, todas las plantas 37-1001 probadas son resistentes, mientras que una variedad utilizada como comprobación susceptible, Staccato (híbrido de Nickerson Zwaan), tiene el 100 % de plantas infectadas con mildiú veloso.

Nombre	Color foliar (1 = verde claro, 5 = verde oscuro)	Verticalidad foliar (1 = horizontal, 5 = erguido)	Vigor foliar (1 = hojas de crecimiento lento, 5 = hojas vigorosas)	Puntas foliares (1 = puntas foliares amarillas o marrones, 5 = puntas foliares verdes saludables)	Número de plantas subidas a flor (=plantas que producen un tallo floral)	% de plantas subidas a flor (sobre el número total de plantas)	Precocidad relativa (medida a través de la caída de las hojas)	Rendimiento (por metro cuadrado)	Rendimiento relativo (100= promedio de experimento)	Peso de bulbo promedio (g)	% de bulbos sin piel	% relativo de bulbos que conservan piel	Calidad de la piel (1 = sin pieles finas alrededor del bulbo, 9 = gran cantidad de pieles finas)	Firmeza (= mm de deformación cuando se comprime, por lo tanto cuanto más bajo mejor)	Número de anillos contados cuando se corta el bulbo
Tasco	3	3	5	3	4	1,0	131,8	8,883	106,6	130	10,6	92,9	6	3,61	4,96
Tasco	3	3	5	3	7	1,8	115,5	8,610	103,4	122	6,0	97,7	6	3,62	5,24
Tasco	3	3	5	3	10	2,8	113,7	8,467	101,6	128	4,9	98,8	7	3,51	5,32
Tasco	3	3	4	3	2	0,6	133,6	8,028	96,4	124	12,3	91,1	6	3,60	4,08
Promedio: Tasco	3	3	5	3	6	2	124	8,50	102	126	8	95	6	4	5
Drago	4	3	4	3	1	0,3	97,5	7,640	91,7	119	4,5	99,2	7	3,38	5,16
drago	3	3	3	3	3	0,8	113,7	7,971	95,7	111	5,4	98,3	6	2,93	4,42
drago	5	3	4	3	3	0,8	79,4	7,694	92,4	118	3,3	100,5	7	3,08	4,63
drago	4	3	5	3	7	1,9	115,5	8,126	97,6	125	6,8	96,9	6	3,26	4,68
Promedio: Drago	3	3	5	3	4	1	106	7,99	96	120	6	98	6	3	5
37-1001	3	3	4	3		0,0	115,5	8,657	103,9	129	13,6	89,8	5	3,57	4,20
37-1001	3	3	4	3	1	0,3	97,5	8,622	103,5	124	6,3	97,4	6	3,17	4,36
37-1001	3	3	4	3	2	0,5	113,7	8,114	97,4	117	8,3	95,3	6	3,19	4,46
37-1001	3	3	5	3		0,0	115,5	8,852	106,3	122	11,8	91,7	6	3,22	4,92
Promedio: 37-1001	3	3	5	3	2	0,4	109,6	8,446	101,4	122	9,1	94,4	6	3,28	4,54

Tabla 7

Ejemplo 7:

A continuación, la línea 3591 o plantas 3591 son plantas resistentes homocigotas que llevan el fragmento de introgresión pequeño, son todas plantas similares a 3591-1 debido a que también contienen un fragmento de introgresión pequeño en un estado homocigota y pertenecen a la misma línea de reproducción.

También se han utilizado de manera satisfactoria plantas 3591 como material de partida para el desarrollo de nuevas líneas de reproducción parentales útiles en la producción de nuevos híbridos de cebolla comerciales, resistentes al mildiú veloso de la cebolla. Las 3591 plantas se cruzan primero con una línea de cebolla endogámica para producir un híbrido F1.

De hecho, a través de retrocruzamiento con otras líneas polinizadoras, el gen de resistencia al mildiú veloso se puede introducir en otras líneas polinizadoras de muchos tipos distintos de cebolla.

Se hace un primer cruzamiento entre una planta resistente que tiene los dos fragmentos de introgresión pequeños que llevan el locus de resistencia y una línea susceptible. Este cruzamiento da lugar a híbridos (los F1) que contienen el fragmento de introgresión pequeño de manera heterocigota. Estas plantas F1 resistentes de manera heterocigota se utilizan para el retrocruzamiento posterior con una línea susceptible o la línea susceptible se utiliza para producir plantas resistentes F1. Tal etapa de retrocruzamiento dará lugar a una población que tiene plantas el 50 % resistentes y el 50 % susceptibles. Esta segregación 1:1 se producirá con cada generación de retrocruza, debido a la herencia del locus de resistencia a Pd dominante. Se pueden fenotipificar todas las plantas susceptibles por la susceptibilidad a mildiú veloso y se las puede eliminar. Se obtienen nuevas líneas endogámicas de cebolla que se pueden utilizar como material progenitor para la producción de híbridos F1 a través de varias etapas de retrocruzamiento seguidas de autopolinización, como conoce un experto en la materia.

Esta herencia se confirma mediante los datos de campo; entre las nueve plantas producidas mediante el cruzamiento sy108a*3591, las nueve plantas son resistentes. De manera similar, entre las cuatro plantas producidas mediante el cruzamiento fra*3591, las cuatro plantas son resistentes. También, de manera similar las 3 plantas producidas a partir del cruzamiento syt*3591 son resistentes al mildiú veloso de la cebolla. Después, estas plantas se retrocruzan como se menciona más abajo.

Ejemplo 8:

Todas las plantas pueden también genotiparse con los marcadores divulgados en la presente invención; entre los 16 híbridos F1 producidos cuando se cruzaron plantas 3591 que tienen los dos fragmentos de introgresión pequeños que llevan el locus de resistencia, con otras diversas líneas parentales endogámicas, cuando se utilizó la pareja de cebadores (A) todas mostraron el fragmento de 61 nucleótidos esperado (marcador P32/M62-061 ligado al fragmento de introgresión pequeño) y no mostraron el fragmento de 79 nucleótidos que normalmente destaca la presencia del fragmento de introgresión grande cuando se utiliza el marcador P32/M62-079 (el par de cebadores (B')).

Referencias

1. Meer, Q.P. van der and Vries, J.N. De. An interspecific cross between *Allium roylei* Stearn and *Allium cepa* L., and its backcross to *A. cepa*. Euphytica 47:29-31, 1990.
2. Kofoet, A. *et al.* Inheritance of resistance to Downy Mildew (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.) from *Allium roylei* Stearn in the Backcross *Allium cepa* L.* (*A. roylei** *A. cepa*). Plant Breeding 105:144-149, 1990.
3. Vries, J.N. De *et al.* Linkage of downy mildew resistance genes Pd1 and Pd2 from *Allium roylei* Stearn in progeny of its interspecific hybrid with onion (*A. cepa* L.). Euphytica 64:131-137, 1992.
4. Vos, P. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. Vol 21, 21: 4407-4414, 1995.
5. Mukerji, K.G. *Peronospora destructor*. CMI Description of Pathogenic fungi and Bacteria No 456, 1975.
6. Viranyi, F. Downy mildew of Onion. DM Spencer, The Downy Mildews. Cap. 21:461-471, 1981.
7. Hildebrand, P.D., y Sutton, J.C. Maintenance of *Peronospora destructor* in onions sets. Canadian Journal of Plant Pathology 2:239-240, 1980.
8. Vries, J.N. De. Onion chromosome nomenclature and homoeology relationships-workshop report. Euphytica 49: 1-3, 1990.
9. Khrustaleva, L.I. y Kik, C. Cytogenetical studies in the bridge cross *Allium cepa* * (*A. fistulosum* * *A. roylei*. Theor. Appl. Genet. 96: 8-14, 1998.
10. Khrustaleva, L.I. y Kik, C. Introgression of *Allium fistulosum* into *A. cepa* mediated by *A. roylei*. Theor. Appl. Genet. 100: 17-26, 2000.
11. Michelmore, R.W. *et al.* Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 9828-9832, 1991.
12. Kalkman, E.R. Analysis of the C-banded karyotype of *Allium cepa* L. Standard system of nomenclature and polymorphism. Genetica 65:141-148, 1984.
13. Rogers y Bendich. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) Plant Molecular Biology manual A6, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Países Bajos; 1-10, 1998.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NICKERSON ZWAAN B.V.

5 <120> Resistencia al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor*

<130> B5982A CS/SA

10 <150> EP 04078320.1
<151> 08-12-2004

<160> 12

15 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Adaptador alfa

25 <400> 1
ctcgtagact gcgtacatgc a 21

<210> 2
<211> 14
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Adaptador alfa

35 <400> 2
tgtacgcagt ctac 14

<210> 3
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Adaptador beta

45 <400> 3
gacgatgagt cctgag 16

<210> 4
<211> 14
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Adaptador beta

55 <400> 4
tactcaggac tcat 14

60 <210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

65 <223> Cebador A

<400> 5

ES 2 572 393 T3

5	<210> 6 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> Cebador A		
	<400> 6 gatgagtct gagtaact		19
15	<210> 7 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> Cebador B		
	<400> 7 gactgctac atgcagaag		19
25	<210> 8 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> Cebador B		
	<400> 8 gatgagtct gagtaaac		19
35	<210> 9 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial		
40	<220> <223> Cebador C		
45	<400> 9 gactgctac atgcagaca		19
50	<210> 10 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> Cebador C		
55	<400> 10 gatgagtct gagtaacca		19
60	<210> 11 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> Cebador C'		
65	<400> 11 gactgctac atgcagaaa		19

ES 2 572 393 T3

	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador C'	
10	<400> 12	
	gatgagtct gagtaacac	19

REIVINDICACIONES

1. Planta de la especie *Allium cepa* o *Allium fistulosum* que es resistente al mildiú veloso de la cebolla que provoca el hongo *Peronospora destructor* (Pd) debido a un locus de resistencia a Pd presente de manera homocigota en el brazo largo del cromosoma 3 en el genoma de dicha planta, estando el locus de resistencia a Pd en un fragmento de introgresión de *Allium roylei*, en el que, al llevar a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Restricción del ADN genómico de dicha planta con las enzimas de restricción PstI y MseI;
- b) Ligamiento con los siguientes adaptadores oligonucleotídicos:

alfa 5'- CTCGTAGACTGCGTACATGCA
 CATCTGACGCATGT - 5', y
 beta 5'- GACGATGAGTCCTGAG
 TACTCAGGACTCAT - 5';

- c) Amplificación selectiva de conjuntos de fragmentos de restricción,

la presencia del locus de resistencia a Pd se caracteriza por

- un producto de amplificación de 61 nucleótidos cuando se utilizan los siguientes cebadores en la etapa c):

(A) 5' - GACTGCGTACATGCAGAAC y 5' - GATGAGTCCTGAGTAACTT, o

- un producto de amplificación de 151 nucleótidos cuando se utilizan los siguientes cebadores en la etapa c):

(B) 5' - GACTGCGTACATGCAGAAG y 5' - GATGAGTCCTGAGTAAAAC o

- un producto de amplificación de 330 nucleótidos cuando se utilizan los siguientes cebadores en la etapa c):

(C) 5' - GACTGCGTACATGCAGACA y 5' - GATGAGTCCTGAGTAACCA.

2. Planta de acuerdo con la reivindicación 1, en la que no hay segmento de introgresión de *Allium roylei* excepto en el brazo largo de ambos homólogos del cromosoma 3.

3. Planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la presencia del locus de resistencia a Pd se caracteriza por un producto de amplificación de 61 nucleótidos cuando se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Restricción del ADN genómico de dicha planta con las enzimas de restricción PstI y MseI;
- b) Ligamiento con los siguientes adaptadores oligonucleotídicos:

alfa 5'- CTCGTAGACTGCGTACATGCA
 CATCTGACGCATGT - 5', y
 beta 5'- GACGATGAGTCCTGAG
 TACTCAGGACTCAT - 5';

- c) Amplificación selectiva de conjuntos de fragmentos de restricción con los siguientes cebadores:

(A) 5' - GACTGCGTACATGCAGAAC y 5' - GATGAGTCCTGAGTAACTT.

4. Planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la presencia del locus de resistencia a Pd se caracteriza por un producto de amplificación de 151 nucleótidos cuando se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Restricción del ADN genómico de dicha planta con las enzimas de restricción PstI y MseI;
- b) Ligamiento con los siguientes adaptadores oligonucleotídicos:

alfa 5'- CTCGTAGACTGCGTACATGCA
 CATCTGACGCATGT - 5', y
 beta 5'- GACGATGAGTCCTGAG
 TACTCAGGACTCAT - 5';

- c) Amplificación selectiva de conjuntos de fragmentos de restricción con los siguientes cebadores:

(B) 5' - GACTGCGTACATGCAGAAG y 5' - GATGAGTCCTGAGTAAAAC.

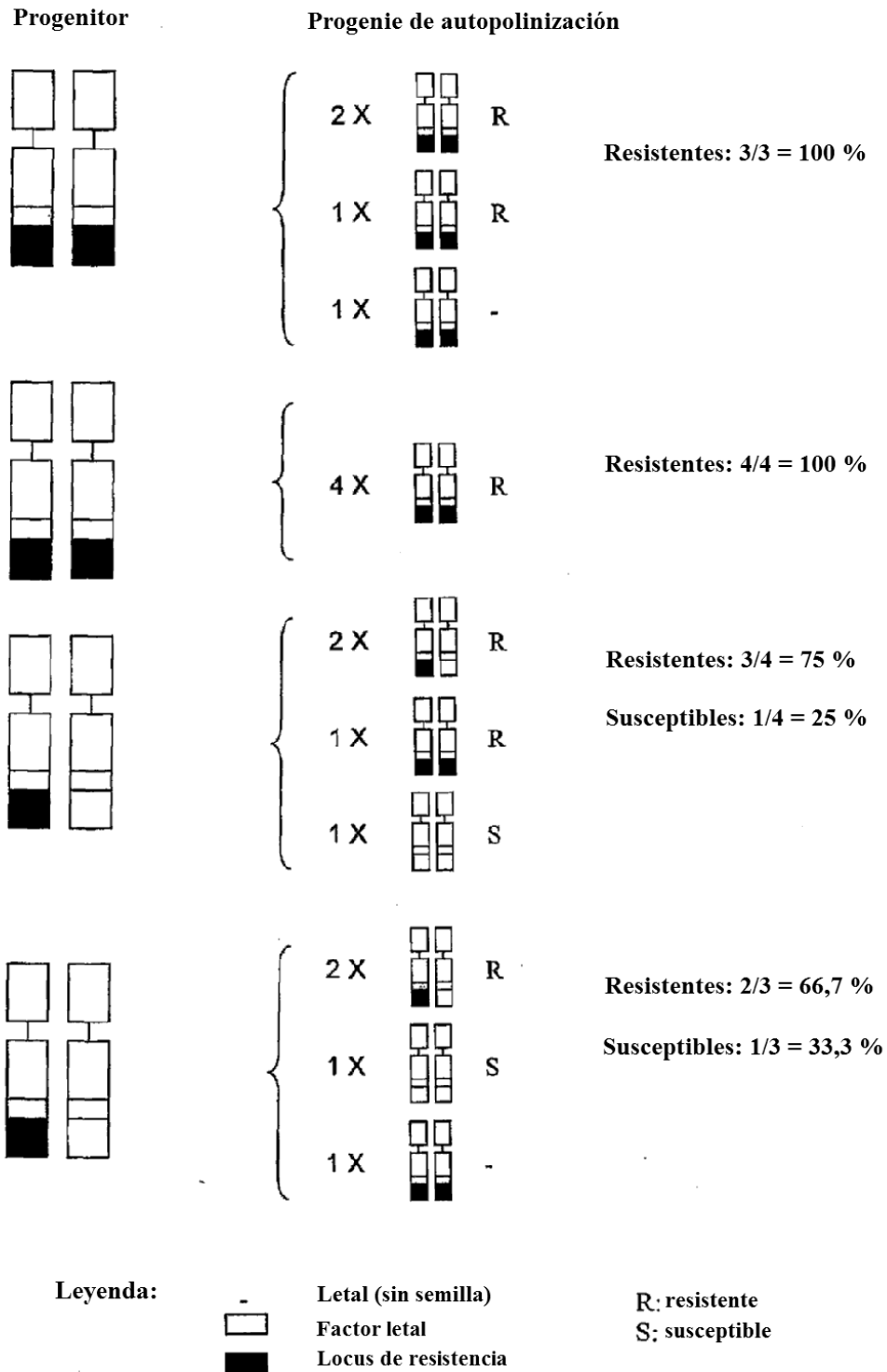


FIGURA 1

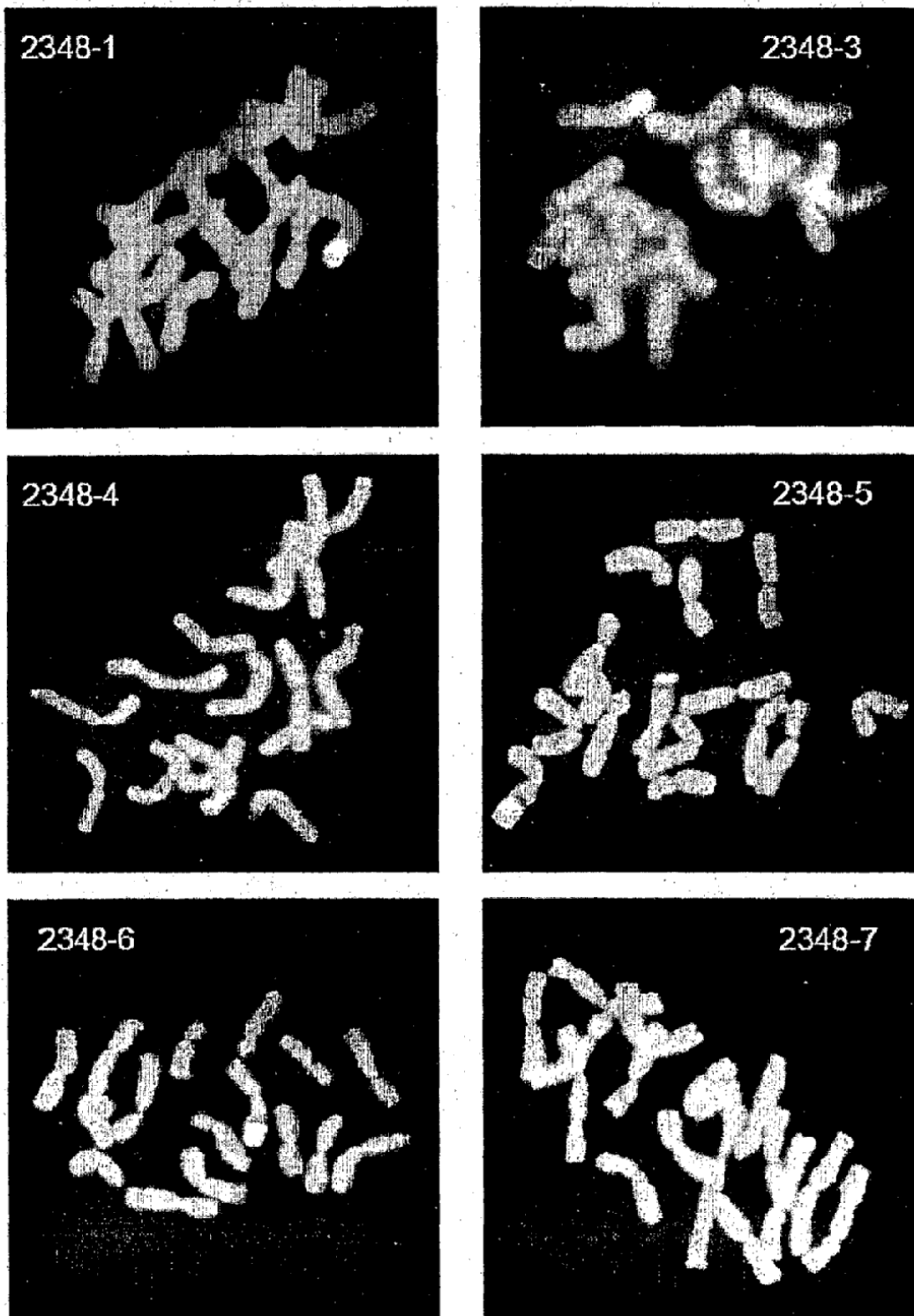


FIGURA 2A

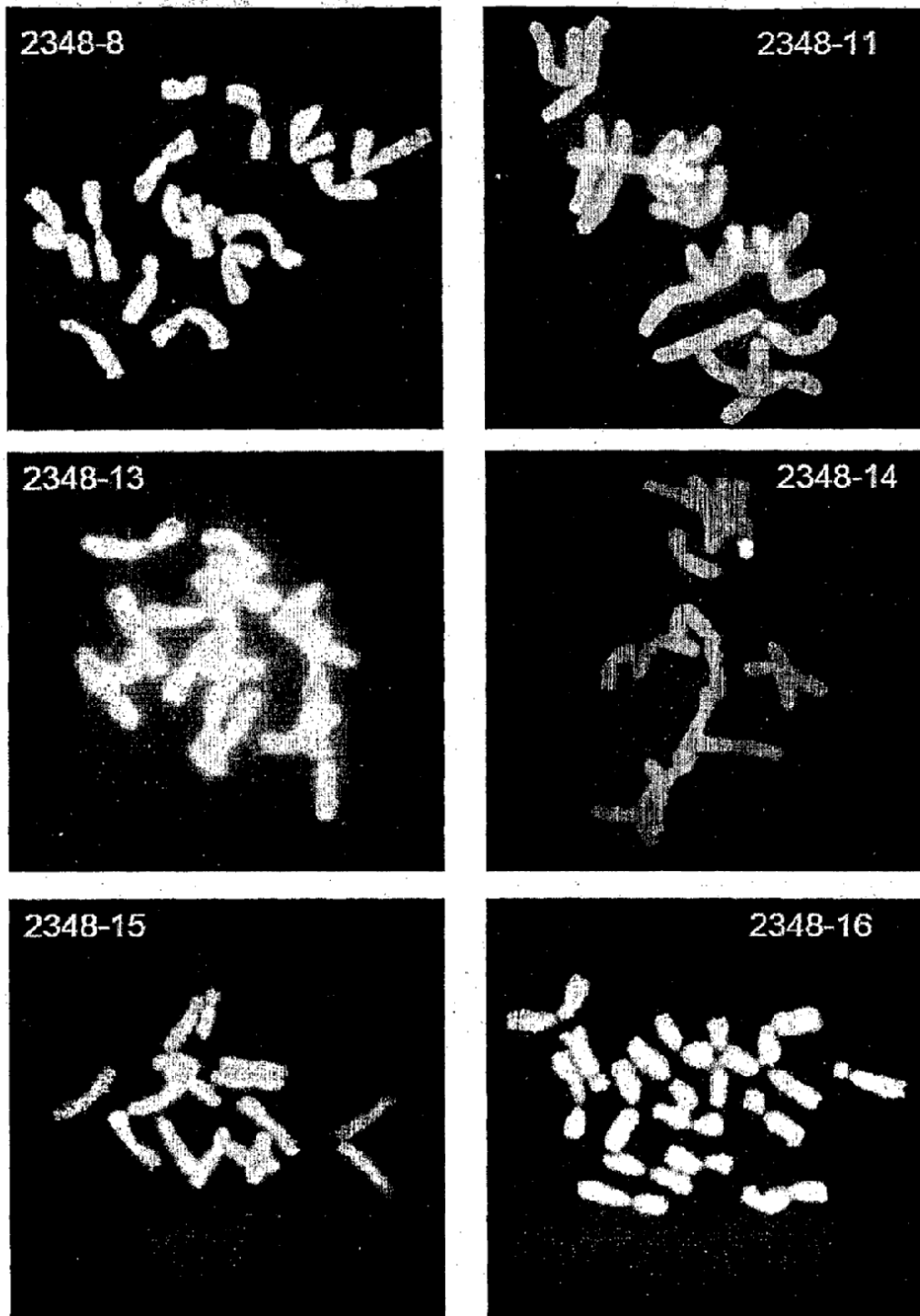


FIGURA 2B

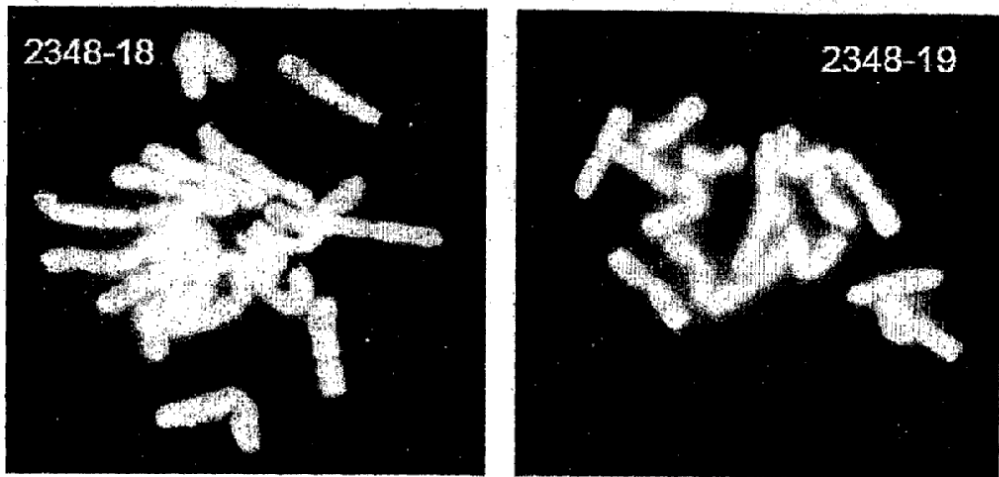


FIGURA 2C

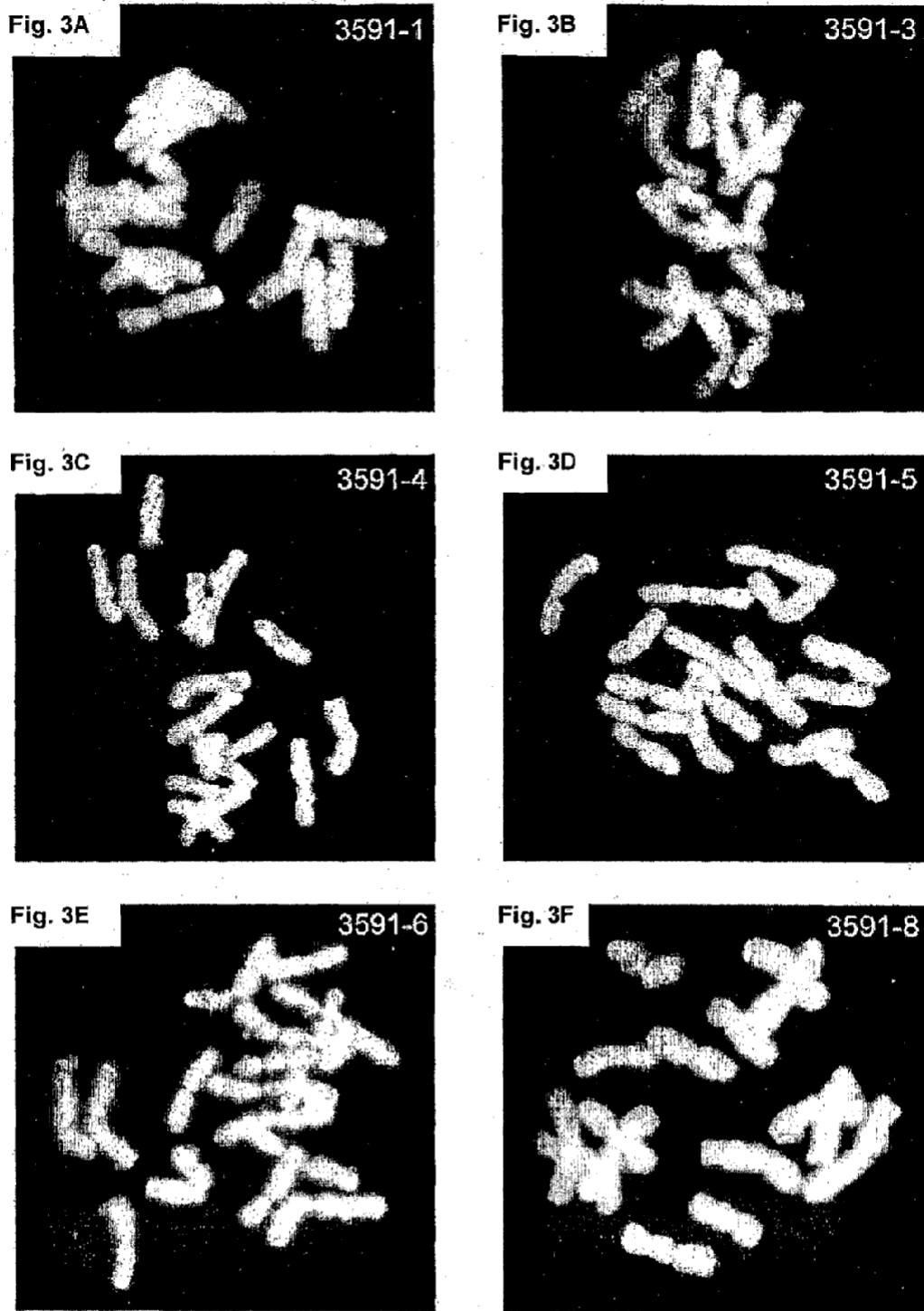


FIGURA 3