

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 586**

51 Int. Cl.:

A01H 5/02 (2008.01)

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 5/12 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2013** **PCT/EP2013/067014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015** **WO15022023**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2013** **E 13752882 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 3032941**

54 Título: **Plantas Cichorium con esterilidad masculina citoplasmática**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.07.2018

73 Titular/es:

BEJO ZADEN B.V. (100.0%)
Trambaan 1
1749 CZ Warmenhuizen, NL

72 Inventor/es:

DE JONG, ELIZABETH, ROSALIEN;
HAARSMa, ADRIANA, DORIEN;
VAN CAPPELLEN, WITTE;
GLAS, CORNELIS;
ZUTT, NICOLAAS, ANTHONIUS y
SCHRIJVER, ALBERTUS, JOHANNES, MARIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 675 586 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática

La presente invención se refiere a las plantas *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática ("CMS") y en particular a plantas de achicoria verde con esterilidad masculina citoplasmática (CMS); plantas de achicoria italiana roja con esterilidad masculina citoplasmática (CMS); plantas de achicoria de hoja roja con esterilidad masculina citoplasmática (CMS); plantas de Treviso con esterilidad masculina citoplasmática (CMS); plantas de Pan de azúcar con esterilidad masculina citoplasmática (CMS); plantas de achicoria blanca con esterilidad masculina citoplasmática (CMS); plantas de endivia Belga con esterilidad masculina citoplasmática (CMS); plantas de achicoria de hoja blanca con esterilidad masculina citoplasmática (CMS); plantas de endivia con esterilidad masculina citoplasmática (CMS); plantas *C. intybus* var. *foliosum* con esterilidad masculina citoplasmática (CMS); plantas *C. endivia* con esterilidad masculina citoplasmática (CMS) y plantas *C. intybus* var. *sativum* con esterilidad masculina citoplasmática (CMS).

Cichorium está disponible en diversas variedades cultivadas claramente diferentes: como achicoria verde, achicoria italiana roja o achicoria de hoja roja, Treviso, achicoria blanca, pan de azúcar, endivia Belga (hoja blanca), achicoria Catalana (todas las *C. intybus* var. *foliosum*), endivia (*C. endivia*), pero también se conoce la achicoria de raíz (*C. intybus* var. *sativum*). Esta última se cultiva por su raíz principal, de la que se obtienen diversos productos como la inulina, saborizantes para la cerveza, sucedáneos del café y también sustratos para la producción de polímeros.

La achicoria de hoja blanca se cultiva inicialmente por su raíz principal, que es forzada a producir en oscuridad la conocida achicoria de hoja blanca, endivia Belga o chicon. Esta imposición se realiza de forma hidropónica o convencional.

Ejemplos de achicoria de hoja (*Cichorium intybus* var. *foliosum*) son la achicoria italiana roja (con hojas abigarradas en rojo y verde, en ocasiones con nerviaciones blancas), Treviso, achicoria Catalana y la achicoria de corazón verde. Es típico el sabor amargo en todas las variedades de achicoria. Otro miembro de *Cichoridaceae* es la endivia, *Cichorium endivia*.

Las *Cichoridaceae* son parte de las *Asteraceae* (formalmente *Compositae*) a las que pertenecen, entre otros, el girasol (*Helianthus*), la lechuga (*Lactuca*), *Calendula*, *Aster* y *Echinacea*.

Según los antecedentes de la técnica para semillas de *Cichorium* disponibles comercialmente (como achicoria italiana roja, Treviso y otras), los híbridos se producen mediante certificación.

La certificación es un fenómeno botánico por el cual hay una competición entre tubos polínicos, que muestran una diferencia en la velocidad de crecimiento. Los tubos polínicos de una misma planta (autopolinización) crecen más lentamente a lo largo del estilo que los tubos polínicos de otra planta que efectúa polinización cruzada. Este mecanismo se explota para aumentar la proporción de polinización cruzada pero la autopolinización, que resulta en la impureza del híbrido deseado, no puede ser excluida. En la práctica, más del 30% de las semillas producidas consisten en productos de la autofertilización, en otras palabras, plantas endogámicas en vez de plantas híbridas. Con el uso de métodos de limpieza de semillas, este porcentaje puede ser reducido al 10-20%, pero es aún indeseablemente alta.

Un inconveniente adicional del uso de la certificación es que durante el mantenimiento de la línea femenina (que presenta certificación) las plantas individuales que producen más polen expanden sus genes en la población más eficientemente, lo que resulta en una pérdida potencial de certificación tras cierto número de generaciones, es decir, una línea parental inservible.

Además, la certificación no está presente en todas las líneas de *Cichorium*, lo que reduce la combinación de posibilidades para producir híbridos de interés comercial.

Para el cultivo de achicoria en todas las formas descritas anteriormente, será ventajoso tener disponibles híbridos F1 muy, preferiblemente substancialmente uniformes al 100%. Estas variedades híbridas de *Cichorium* presentan diversas ventajas sobre las líneas disponibles comúnmente ahora.

La ventaja más importante es la excelente uniformidad que un híbrido F1 así presentaría, es decir, una uniformidad substancial del 100%. Esto permite una recolección que puede ser realizada de una sola vez o simultáneamente, además de resultar en una pérdida mínima tras clasificar el cultivo.

Por ejemplo, la achicoria italiana roja consigue un color menos intenso cuando el cultivo es expuesto a altas temperaturas y luz solar intensa durante tiempos prolongados. La posibilidad de recolectar simultáneamente este producto daría como resultado una reducción en las pérdidas para el agricultor.

Cuando la planta *Cichorium* es muy o substancialmente uniforme al 100% respecto a la composición genética, es decir, el genoma, de la planta *Cichorium*, hay varias ventajas, tanto para el productor de las semillas como para el agricultor del cultivo.

Cuando se puede suministrar un híbrido F1 muy uniforme, el productor tiene la ventaja de que pueden usarse más combinaciones de líneas parentales, lo que resulta en un intervalo más amplio de híbridos disponibles.

Actualmente, tanto los tratamientos de semillas como la preparación y la comparación o selección de semillas son de poco uso, dado que la uniformidad de los lotes de semillas es demasiado baja. Cuando esté disponibles las semillas de alta calidad de los híbridos muy uniformes deseados, resultarán útiles para las semillas procesos como la preparación y otros tratamientos de la tecnología de la semilla.

Para el agricultor, las ventajas de un híbrido muy uniforme son un periodo corto de recolección y procesamiento del total del cultivo, que consiste en un producto muy homogéneo sin los llamados fuera de tipo. Por esta razón, se requiere menos trabajo para recolectar el cultivo y prepararlo para la venta.

Un híbrido muy o sustancialmente uniforme al 100% tiene una calidad uniforme, especialmente en cuanto al color cuando se considera, p. ej. la achicoria italiana roja. Las variedades ahora disponibles en el mercado no pueden garantizar esta uniformidad.

Finalmente, se aprecia que los híbridos F1 muy uniformes mostrarán mejor germinación de las semillas.

La producción de híbridos de *Cichorium endivia* (endivia) es imposible según los antecedentes de la técnica actuales; un mecanismo como la certificación no está presente en la endivia. Por ello la endivia es un cultivo 100% auto-polinizante que, aunque muestra un alto nivel de uniformidad, presenta una heterosis pobre.

Para mejorar los puntos definidos anteriormente se han realizado muchas investigaciones dirigidas a desarrollar otros métodos para la hibridación en *Cichorium*. Uno de los métodos se describe en solicitudes de patente hechas por Enza Zaden (NL 1001554) y Florimond Desprez (WO 97/45548) donde un factor citoplasmático para el girasol (*Helianthus annuus*) se introduce por fusión celular en especies de *Cichorium*. Esto dio como resultado material reproductor de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática (CMS). Una solicitud similar de patente ha sido presentada por Sakata Seeds (WO 2007/049730), en donde CMS de girasol se transfiere a lechuga, *Lactuca sativa*.

Otra estrategia más se describe en la solicitud de patente WO 2012/163389 de Az. Agrícola T&T, donde la esterilidad masculina recesiva, o genéticamente codificada en el núcleo se induce en *Cichorium* mediante mutagénesis. Los híbridos F1 producidos con este sistema son, debido al carácter recesivo del rasgo descrito, machos fértiles. Un inconveniente adicional de este sistema es que las líneas maternas de los machos estériles (designadas como ms/ms) deben ser propagadas vegetativamente mediante métodos *in vitro* o *in vivo*.

Considerando lo anterior, entre otros objetos, un objeto de la presente invención es producir plantas *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática evitando los anteriores inconvenientes del estado de la técnica.

El objeto anterior, entre otros objetos, ha sido cumplido por la presente invención, produciendo plantas como se describe en las reivindicaciones anexas.

Específicamente, el objeto anterior, entre otros objetos, ha cumplido por la presente invención, según un primer aspecto, mediante plantas de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática que comprenden mitocondrias de *Lactuca*, en donde las mitocondrias de *Lactuca* anteriores comprenden al menos una secuencia de ácidos nucleicos mitocondriales seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y en donde dicha planta de *Cichorium* comprende un citoplasma materno derivado de una planta según el depósito NCIMB 42125.

Se inició un programa de investigación para identificar especies de plantas que podrían servir como donantes válidos para la introducción de esterilidad masculina citoplasmática (CMS) en *Cichorium*. En este contexto, "válido" también significa que se evitan los inconvenientes del estado de la técnica.

En la lechuga, *Lactuca sp.*, no está presente la CMS. *Lactuca* y *Cichorium* pertenecen a la familia de las *Asteraceae* y dentro de esta familia a la tribu de las *Cichorieae* o *Lactuceae*, respectivamente.

La combinación de *Lactuca* y *Cichorium* se estudió para determinar si la combinación de los núcleos de *Cichorium* con el citoplasma de *Lactuca* daría como resultado un *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática (CMS).

En la lechuga, *Lactuca sp.*, no está presente CMS. *Lactuca* y *Cichorium* están relacionadas, ambas pertenecen a la familia de las *Asteraceae* y, dentro de esta familia, a la tribu de las *Cichorieae* o *Lactuceae*; por tanto, esta planta fue elegida como candidata tanto para cruces como para fusiones celulares asimétricas con *Cichorium*.

Con la *Lactuca* mencionada anteriormente, la combinación con *Cichorium* se estudió para determinar si la combinación del núcleo de *Cichorium* con el citoplasma de *Lactuca* daría como resultado un *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática. Esta investigación se centró especialmente en varias especies de *Lactuca* dado que la investigación inicial mostró que el cruce de *Cichorium* con *Lactuca* dio como resultado un número –limitado– de semillas. Las plantas que crecieron a partir de estas semillas se identificaron como híbridos tanto por citometría de flujo como por estudios moleculares.

Tras la obtención de este híbrido entre *Cichorium* y *Lactuca* será necesario realizar varios retrocruzamientos para recuperar el fondo genético de *Cichorium*. Con un cultivo como *Cichorium* se requerirán al menos 8 años para reconstruir el genoma completo de estas especies en el producto de los cruces. Además, un cruce entre distintas especies es muy ineficiente, especialmente en las primeras generaciones, por lo que el total de semillas obtenido inicialmente será muy limitado.

Tras varias generaciones el total de genoma de *Lactuca* está suficientemente diluido pero una generación consanguínea, producida por autopolinización, se requiere para seleccionar la línea parental genéticamente estable candidata para la producción de híbridos. Sin embargo, dado que este material presentará esterilidad masculina, este último paso de autopolinización es imposible.

Para conseguir una solución a los inconvenientes mencionados anteriormente Bejo Zaden B. V. realizó fusiones celulares asimétricas entre especies de *Cichorium* y *Lactuca* sp.

Brevemente, se aislaron protoplastos de ambas especies. Los protoplastos de *Cichorium* (el aceptor) se trataron con yodoacetamida (IOA) o yodoacetato (IA) para inactivar el citoplasma. Los protoplastos de *Lactuca* sp. (el donante) se trataron con radiación ionizante para inactivar o destruir el genoma nuclear, pero manteniendo elementos genéticos activos en el citoplasma (cloroplastos y mitocondrias).

Tras una fusión celular mediada por polietilenglicol/ Ca^{2+} , se forman una o más células nuevas con el genoma nuclear (y por tanto las características hortícolas) de *Cichorium*, pero con el citoplasma de *Lactuca*. Esta fusión se puede realizar bien en tubos de ensayo o en placas Petri. Aquí el polietilenglicol actúa como medio para promover la asociación de las células, un alto pH y los iones Ca^{2+} son un pre-requisito para la fusión celular efectiva. Se usó un procedimiento de tinción con diacetato de fluoresceína para asegurar que las células resultantes son viables.

Se usó un medio adecuado que comprende agua, sales, vitaminas, azúcares y hormonas vegetales para la formación de callos. Seguidamente, se realizó la regeneración de las plantas promoviendo el nacimiento de brotes que finalmente son enraizados; también estas etapas dependen de la aplicación de hormonas vegetales adecuadas.

Tras la regeneración, se chequea que el contenido en ácido desoxirribonucleico (ADN) de las plantas sea correcto mediante citometría de flujo. Las plantas diploides que se obtienen como resultado del ensayo son sometidas después a un ensayo molecular para comprobar la presencia de citoplasma de *Lactuca*. Con este fin se usó la técnica de polimorfismo de microsátélites amplificados al azar (RAMP) para discriminar entre los citoplasmas de *Cichorium* y *Lactuca*.

Investigaciones adicionales sobre plantas que contienen el material nuclear de *Cichorium* combinado con el citoplasma de *Lactuca* han demostrado que, entre las plantas fusionadas regeneradas, hay plantas individuales que presentan esterilidad masculina que retienen fertilidad femenina, es decir, plantas según la presente invención. La frecuencia con la que dichas plantas se identificaron fue de 1 entre 21 plantas fusionadas originales.

La planta obtenida tenía flores con granos de polen visibles en las anteras pero éstos son de menor tamaño que los granos de polen salvaje y usando una técnica de tinción con diacetato de fluoresceína, se mostró que el polen de la planta híbrida no era viable. Por consiguiente, la F1 de las plantas híbridas son machos estériles. Por tanto, a partir de las plantas fusionadas anteriores, se obtienen las plantas *Cichorium* presentes con capacidad para producir híbridos 100% puros de *Cichorium*.

Una muestra representativa de una planta según la presente invención se depositó el 28 de marzo de 2013 en el NCIMB, Fergusson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Gran Bretaña con número de depósito NCIMB 42125.

Según una realización preferida de este primer aspecto, la presente invención se refiere a plantas *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática, en donde las plantas *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática son identificables además por un marcador molecular de 1592 bp que usa la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 32.

Según otra realización preferida de este primer aspecto, la presente invención se refiere a plantas *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática, en donde las plantas *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática son identificables además por un marcador molecular de 293 bp que usa la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 34.

Según una realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a plantas *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática que tienen al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o diez de las presentes secuencias de ácidos nucleicos mitocondriales.

Las plantas según la presente invención se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en achicoria verde, achicoria italiana roja, achicoria de hoja roja, Treviso, achicoria blanca, pan de azúcar, endivia Belga, achicoria de hoja blanca, achicoria Catalana, *C. intybus* var. *foliosum*, *C. endivia* and *C. intybus* L. var. *sativum*.

Según un segundo aspecto, la presente invención se refiere a métodos para identificar una planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática, el método comprende que se determine en una muestra de dicha planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática una o más de las presentes secuencias mitocondriales, es decir,

secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

Según un tercer aspecto, la presente invención se refiere a métodos para identificar una planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática, el método comprende que se determine en una muestra de dicha planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática un marcador molecular de 1592 bp que usa la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 32 y/o un marcador molecular de 293 bp que usa la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 34.

Se describen las secuencias de ácidos nucleicos mitocondriales seleccionadas del grupo que consisten en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

Se describen las plantas de *Cichorium* y *Lactuca* con esterilidad masculina citoplasmática, en donde las plantas híbridas con esterilidad masculina citoplasmática comprenden mitocondrias de *Lactuca* y dicha mitocondria comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos mitocondriales seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

Se describen plantas híbridas con esterilidad masculina citoplasmática que son una planta híbrida con esterilidad masculina citoplasmática según el depósito NCIMB 42125 y/o que comprende mitocondrias derivadas de una planta de *Lactuca* según el depósito NCIMB 41985.

Se describe el uso de mitocondrias de una planta de *Lactuca* para la obtención de una planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática, el presente uso comprende preferiblemente una fusión de protoplastos de un protoplasto de *Lactuca* con el genoma nuclear inactivado como donante y un protoplasto de *Cichorium* con el genoma mitocondrial inactivado como aceptor.

A continuación, la presente invención se describirá además en ejemplos de realización preferida de la presente invención. En los ejemplos se hace referencia a las figuras, en donde:

Figura 1: muestra gráficos de citometría de flujo de: (A) *Cichorium intybus* L. (arriba a la izquierda); (B) *Lactuca sp.* (arriba a la derecha); (C) Híbrido 1 (según la presente invención; abajo a la izquierda); y (D) una muestra mezcla de A, B y C (abajo a la derecha);

Figura 2: muestra el resultado de la caracterización de ADN nuclear usando la técnica de polimorfismo de microsatélites amplificados al azar. Desde el carril de la izquierda al carril de la derecha, *Cichorium intybus* (P155); *Lactuca sp.* (P157); híbridos 1 a 3 (H1-H3, es decir, plantas híbridas de un cruce entre P155 y P157; las bandas discriminadas se indican;

Figura 3: muestra la representación gráfica del tamaño de polen de *Cichorium*, *Lactuca* y la planta de fusión seleccionada, P153. Leyenda para este gráfico:

- Eje X: diámetro de los granos de polen en μm^2
- Eje Y: porcentaje de granos de polen presentes en los distintos tamaños;

Figura 4: muestra ARRIBA: Fotografía de una flor de P153, una planta seleccionada de los productos de fusión obtenidos descritos. ABAJO: detalle de las anteras que muestra granos de polen (no funcionales);

Figura 5: muestra ARRIBA: Fotografía de una flor fértil de *Cichorium intybus* L. ABAJO: detalle de las anteras.

Ejemplos

Ejemplo 1. Esterilización y siembra de las semillas

Semillas tanto del donante (*Lactuca sp.*, depositada en 1 de junio de 2012 en el NCIMB, Ferguson Building, Craibston Estate, Bucksburn, Aberdeen, Gran Bretaña como depósito NCIMB 41985, como del aceptor (*Cichorium intybus* L.) se sembraron *in vitro*. Para ello se esterilizaron 100 semillas de cada especie mediante un lavado en 70% de etanol en agua, seguido por un tratamiento con una solución de lejía (1% NaOCl (peso/volumen) + 0,01% Tween80 (volumen/volumen) en agua desmineralizada). Tras un lavado extenso con agua desmineralizada, las semillas se introdujeron en un medio adecuado como ½ Murashige y Skoog (MS)¹⁵ y se introdujeron en un cuarto de crecimiento a 25°C, 16/24 horas de luz. Tras 4 semanas las plantas fueron adecuadas para el aislamiento de protoplastos.

Ejemplo 2. Aislamiento de protoplastos

Se recolectaron hojas jóvenes con la superficie esterilizada de plantas de 4 semanas de vida. Estas hojas se cortaron en fragmentos de 1-2 mm en placas de Petri tratadas para cultivos (Greiner bio-one, producto 664160) con

solución de plasmólisis WS9M. Tras recolectar todo el material, esta solución se reemplazó por 20 ml de solución enzimática que contenía enzimas que degradan la pared celular como la pectinasa y/o celulasa. Tras una incubación durante toda la noche (oscuridad, 25°C) en un agitador orbital a una velocidad de 30 rpm, el material se tamizó en filtros de 110 µm y 53 µm respectivamente; dichos filtros se lavaron dos veces con 10 ml de solución de lavado.

- 5 El filtrado recogido se centrifugó durante 5 minutos a 60xg. Tras resuspender el precipitado en 10 de solución de lavado, se repitió esta etapa de centrifugación. Los protoplastos se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento posterior.

Ejemplo 3. Control de viabilidad

- 10 Se realizó una prueba de viabilidad de los protoplastos aislados y de los granos de polen con diacetato de fluoresceína. Para ello, se analizaron muestras de los protoplastos teñidos, tanto del donante como del aceptor, o granos de polen recolectados del donante o de plantas fusionadas seleccionadas, con un microscopio de fluorescencia usando los filtros apropiados, con una ampliación de 10 aumentos (10x).

Las células viables se podían reconocer por el color amarillo-verdoso brillante, las células no viables no fluorescen.

Ejemplo 4. Pre-tratamiento de protoplastos aislados

- 15 Se trataron los protoplastos aislados del donante (*Lactuca*) con una fuente de radiación ionizante adecuada (p. ej. una fuente de radiación Roetgen o gamma). Una dosis adecuada está dentro del intervalo de 250-500 Gray como medida de la energía absorbida. Se inactivaron los orgánulos celulares de protoplastos aislados del aceptor (*Cichorium intybus* var. *foliosum*), mediante un tratamiento con una concentración final de yodoacetamida de 10 mM (Proveniente de una solución madre y yodoacetamida al 60 mM) durante 10 minutos a 4°C. Tras este tratamiento las
- 20 células se lavaron dos veces con solución de lavado y se centrifugaron a 60xg durante 5 minutos.

Ejemplo 5. Fusión de protoplastos

Se añadieron 1×10^6 protoplastos por tubo de 10 ml (fondo redondo, Greiner, número de catálogo 163189) en solución de lavado (en una proporción de aceptor : donante de 1:1 ó 1:2).

- 25 Tras su centrifugación (5 minutos a 60xg) cada precipitado se resuspendió en 0,3 ml de solución de lavado. Después se añadieron 0,4 ml de solución de polietilenglicol 1500 por tubo de ensayo dejando caer gotas individuales en los tubos; no se permitió mezclado adicional en este punto. Tras incubar durante 30 minutos, se añadieron 0,8 ml de solución de dilución de polietilenglicol, dejándola deslizar despacio por la pared del tubo de ensayo. Se mantuvieron las células durante 10 minutos sin mezclado adicional.

- 30 Después de esto, se rellenaron los tubos con solución de CPW- Ca^{++} hasta un volumen final de 10 ml, se centrifugaron las células sin mezclado adicional durante 5 minutos a 60xg. Después de tres lavados repetitivos con CPW- Ca^{++} los sedimentos se resuspendieron en medio de cultivo PM1 a una densidad final de 20,000 protoplastos por mililitro.

Ejemplo 6. Cultivo de protoplastos fusionados

Ejemplo 6a. Usando medio de regeneración líquido:

- 35 El cultivo se realizó en la oscuridad a 25°C, reemplazando parcialmente el medio de cultivo cada semana:

- placas de 6 cm: se reemplazaron 3 ml (de 4,5 ml) por 3 ml de medio PM1 de nueva aportación.

- placas de 9 cm: se reemplazaron 5 ml (de 9 ml) por 5 ml de medio PM1 de nueva aportación.

- 40 Tan pronto como se observaron las primeras divisiones celulares (estado celular 2 a 4) el medio de cultivo se reemplazó por medio PM2, este medio también fue reemplazado parcialmente de forma semanal, como se ha descrito aquí anteriormente.

Se colocaron callos de 2 mm de diámetro en medio sólido CRM a 1000 lux. Tan pronto como los callos se volvieron verdes, se aumentó la cantidad de luz hasta aproximadamente 1700 lux. Los callos sin brotes se transferían a medio CRM de nueva aportación cada tres semanas.

- 45 Los brotes emergentes se cortaron de los callos, dejando detrás la mayor cantidad posible de callo, y se colocaron en medio MS30 con Gelrite en frascos o placas de Petri. Para promover el enraizamiento, los brotes se cortaron para retirar cualquier callo residual y se transfirieron a medio MS30-Gelrite de nueva aportación.

Ejemplo 6b. Embebidos en alginato:

- 50 Partiendo de los protoplastos fusionados que se han descrito en el ejemplo 5, los protoplastos fusionados se resuspendieron en solución A; cada tubo contenía 1×10^6 protoplastos. Se añadieron 2,5 ml de solución A a cada tubo; después de resuspender cuidadosamente las células, se añadieron 2,5 ml de solución de alginato. Se

colocaron gotas de 1 ml de suspensión en medio sólido B. Al cabo de 1 hora, el medio solidificado que incluía los protoplastos se lavó con medio PM1 y se transfirió a placas que contenían 3 o respectivamente 6 ml de medio PM1 (placas de Petri de 6 ó 9 cm de diámetro, respectivamente). Los cambios de medio adicionales fueron similares a los descritos en el ejemplo 6a.

- 5 Tan pronto como los callos alcanzaron un diámetro de 2 mm, se disolvió la matriz de alginato reemplazando el medio de cultivo por solución de citrato de sodio 50 mM. Cada disco de alginato se cortó en 8 piezas y los discos se colocaron en un agitador orbital durante 2 horas (30 rpm).

Los micro-callos se recogieron usando una pipeta y se transfirieron a un tubo de ensayo. Se añadió medio PM2 a este tubo hasta un volumen final de 10 ml y después el tubo se centrifugó durante 5 minutos a 60xg.

- 10 Tras lavar dos veces con medio PM2, los callos se colocaron en medio CRM a 1000 lux; los callos que se volvieron verdes se cultivaron además a 1700 lux. Los callos se mantuvieron en este medio y se transferían, en caso necesario, a medio CRM de nueva aportación cada tres semanas.

Los brotes que emergieron de estos callos se cortaron del callo y se colocaron en medio MS30-Gelrite, bien en placas de Petri o en frascos de cristal, los brotes se transfirieron a medio de nueva aportación de la misma composición hasta que se formaron las raíces. Las plantas enraizadas se colocaron en medio MS30.

- 15

Ejemplo 7. Determinación del nivel de ploidía.

Se determinó el nivel de ploidía relativo de plantas resultantes de fusiones celulares o cruces entre plantas de *Cichorium* y *Lactuca*. Para ello, se tomó una parte pequeña de tejido de la hoja de 1 cm² de las plantas examinadas y se trocó con una hoja de afeitar en el tampón para ploidía CyStain® UV (Partec, Múnich, Alemania).

- 20 Tras la filtración, se determinó el nivel de ploidía de la muestra usando un citómetro de flujo Partec PA y se comparó con el resultado de las muestras de las plantas de *Cichorium* y *Lactuca*. Solamente se reservaron las plantas diploides, resultantes de fusiones celulares.

Las plantas resultantes de cruces entre *Cichorium* y *Lactuca* sp. presentan un nivel de ploidía intermedio entre *Cichorium* y *Lactuca* sp. (Figura 1).

- 25 Ejemplo 8. Caracterización molecular del ADN genómico

Se recolectaron varias semillas resultantes del cruce entre *Cichorium* (ID = P155) y *Lactuca* (ID = P157), de las cuales se analizaron tres semillas germinadas como se describe en el ejemplo 7 y se identificaron como plantas híbridas. Para caracterizar más estas plantas, se realizó un análisis molecular.

- 30 Se aisló el ADN de estas plantas híbridas putativas y de ambos parentales, siguiendo un procedimiento de aislamiento estándar, comenzando con explantes de hojas de ± 0,3 cm².

Se realizó un análisis de polimorfismo de microsatélites amplificados al azar en estos ADN aislados con dos oligonucleótidos cebadores que generan polimorfismos entre *Cichorium* y *Lactuca*. El resultado mostró inequívocamente que la planta híbrida contenía ADN genómico de ambos parentales, demostrando así que esta planta era además un híbrido genómico entre *Cichorium* y *Lactuca*.

- 35 Los oligonucleótidos cebadores para la reacción fueron:

Bejop09631 AGTCGGGTGG (SEQ ID NO: 37; cebador de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)).

Bejop01751 CCAGGTGTGTGTGTGT (SEQ ID NO: 38; cebador de inter-secuencias simples repetitivas (ISSR)).

Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

- 40 2 minutos a 93°C

40 ciclos de: 30 s a 93°C - 30s a 35°C – 90 s a 72°C

5 minutos a 72°C

El calentamiento se realiza a 0,3 °C/s

Ejemplo 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida

- 45 Se usó un analizador de ADN Gene ReadIR 4200 (Licor Inc.) para analizar los patrones de los polimorfismos de microsatélites amplificados al azar. Se pueden separar fragmentos de ADN que difieren en 1 par de bases sobre la base de una concentración óptima de acrilamida del 6,5%. Se usaron cebadores marcados (marcas de colorante

infrarrojo) para observar estos fragmentos, una tercera parte del total de cebador directo se reemplazó por un cebador marcado idéntico.

El resultado mostró inequívocamente que las plantas obtenidas contenían ADN genómico de ambos parentales, demostrando así que estas tres plantas (de H1 a H3) eran además híbridos entre *Cichorium* y *Lactuca* (Figura 2).

5 Ejemplo 10. Caracterización del ADN mitocondrial de las plantas fusionadas seleccionadas

Se caracterizó el ADN mitocondrial para demostrar que el citoplasma de *Cichorium* fue reemplazado por el citoplasma de *Lactuca*.

10 Los tampones usados son esencialmente como se describe. Sin embargo, algunos tampones se ajustaron como se indica en la sección de "Soluciones y reactivos". Todas las etapas experimentales se realizaron con tampones pre-enfriados y a 4°C, salvo que se especifique de otro modo.

Se homogenizaron 100 gramos de hojas frescas con un homogenizador en 250 ml de tampón de triturado. El material homogeneizado se filtró mediante vacío a través de 4 capas de algodón y dos capas de malla de nylon (75 µm). El residuo fue homogenizado también usando un mortero y mano de mortero pre-enfriados y filtrado posteriormente como se describe.

15 Los filtrados se agruparon y centrifugaron durante 10 minutos a 1,000xg; el sobrenadante se volvió a centrifugar a 2,000xg. Finalmente, las mitocondrias se recogieron mediante centrifugación a 16,000xg. El precipitado resultante se resuspendió usando una brocha de pintura en 10 ml de tampón de almacenamiento de ADNasa.

20 Después de la centrifugación a 2,000xg, el precipitado resultante se pipeteó en un tubo de centrífuga y se añadieron 50 µl de MgCl₂ 2 M y 200 µl de ADNasa a 5mg/ml. Tras una incubación de una hora, se pipetearon 20 ml de tampón de conservación bajo esta mezcla.

25 Tras la centrifugación a 14,000xg, el precipitado resultante se resuspendió en 10 ml de tampón de conservación. La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 16,000xg, el precipitado se disolvió en 600 µl de tampón de lisis y se transfirió a un tubo de ensayo Eppendorf de 1,5 ml. En este lisado que contiene el ADN mitocondrial se disolvió 1 mg de proteinasa K y se añaden 10 µl de solución ARNasa-A. La incubación fue primero de 60 minutos a 37°C, seguida de 30 minutos de incubación a 65°C.

30 Tras esta incubación, el ADN se precipitó añadiendo 200 µl de Acetato potásico 5 M y se mezcló rotando el tubo de ensayo, que se dejó entonces 15 minutos en hielo como máximo. Después se centrifugó durante 10 minutos a 20,000xg a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN se extrajo posteriormente con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y cloroformo/alcohol isoamílico. La fase acuosa restante se mezcló con 400 µl de isopropanol y 27 µl de acetato de amonio 7,5 M.

Tras centrifugar durante 10 minutos a 20,000xg (20°C) el precipitado restante se lavó con 500 µl de etanol al 70% en agua y se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 20,000xg (20°C). Tras secar, el ADN resultante se disuelve en 200 µl de tampón Tris-ácido etilén diaminotetra acético (EDTA).

35 Se realizó una segunda precipitación del ADN añadiendo 20 µl de acetato de sodio a 7,5 M y 150 µl de isopropanol, la mezcla se mezcló suavemente durante unos pocos segundos.

La siguiente centrifugación es de 10 minutos a 2,000xg (20°C). El precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70% en agua y se volvió a centrifugar brevemente (2 minutos a 20,000xg (20°C). El precipitado se secó y se disolvió en 22 µl de agua ultra pura estéril. El almacenaje fue a 4°C.

40 Se determinó la pureza y concentración del DNA usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000, un fluorímetro Qubit 2.0 y técnicas estándar de electroforesis en gel de agarosa.

La secuencia del ADN mitocondrial aislado se determinó por secuenciación de próxima generación utilizando técnicas de secuenciación generalmente conocidas por aquella persona entrenada en la técnica.

45 Esta secuenciación dio como resultado la identificación de diversas regiones en donde el ADN mitocondrial (ADNmt) de la planta de *Cichorium* CMS seleccionada es igual bien a la planta fértil *Cichorium* original o al donante *Lactuca*, lo que demuestra que el ADN mitocondrial de la planta de *Cichorium* CMS seleccionada es un reordenamiento del ADNmt de la planta fértil *Cichorium* original y del donante *Lactuca*.

50 Para ello, se desarrollaron 4 grupos de cebadores de PCR destinados a identificar el ADNmt reordenado único de las plantas fusionadas seleccionadas que llevan al fenotipo CMS. También se desarrollaron grupos de 17 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) como una caracterización adicional del producto fusionado seleccionado (**Tabla 2**). A partir de estos datos se concluye que la planta de *Cichorium* CMS seleccionada contiene un ADN mitocondrial reorganizado único con fragmentos de ambas líneas parentales que son responsables del carácter CMS de la planta descrita. Los detalles experimentales se muestran en las tablas mencionadas anteriormente.

Tabla 1. Datos para las reacciones de PCR que discriminan entre los parentales para la fusión y los *Cichorium* CMS seleccionados

Combinación de cebadores	Secuencia del cebador directo	Secuencia del cebador reverso	<i>Lactuca</i>	<i>Cichorium</i> fértil	<i>Cichorium</i> CMS	Tamaño del fragmento
1	SEQ ID 29	SEQ ID 30	-	+	+	611 bp
2	SEQ ID 31	SEQ ID 32	+	-	+	1592 bp
3	SEQ ID 33	SEQ ID 34	+	-	+	293 bp
4	SEQ ID 35	SEQ ID 36	-	+	+	107 bp

SEQ ID 29: GCCTCCAGGGTATGATCCTTAA

5 SEQ ID 30: CGAGCACTTATTTGACCTGTGT

SEQ ID 31: TGCTAACGAGGTTCAATGATG

SEQ ID 32: TTCGATTCAGGATCAAGCCCAG

SEQ ID 33: TCGATATTCTTTTCGCGACAGG

SEQ ID 34: TTAGGTTATTTGTTGGTCGCC

10 SEQ ID 35: TTTATAGACAGCGACTCCCTCC

SEQ ID 36: ACCTGAAGGGAGTTATGGCATT

Las condiciones para esta reacción fueron como sigue:

15 Se aisló el ADN total de tejido de hojas jóvenes como se describe y se trataron con ARNasa A/T1. La integridad del ADN se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se diluyó el ADN de todas las muestras a 15 ng/μl para las reacciones de PCR. El total de ADN molde fue de 15 ng por reacción de PCR. La PCR para ambas combinaciones de marcadores se llevó a cabo usando Biomix Red (GC Biotech) en reacciones de 20 μl con 10 pmol de cada cebador mencionado anteriormente. Los parámetros de la PCR fueron:

1 minuto a 94°C

30 ciclos de: 15 s a 94°C; 15 s a 58°C; 1 minuto a 72°C

20 5 minutos a 72°C

Almacenar a 4°C.

Se cargaron 5 μl de las reacciones de PCR en un gel de agarosa al 1% y se separaron usando técnicas estándar, conocidas por el experto en la técnica.

Tabla 2. Secuencia de los 17 marcadores SNP desarrollados para discriminar entre los parentales para la fusión y la planta fusionada seleccionada. Se indican las secuencias usadas y entre corchetes ([N/N]) está el nucleótido único que difiere entre las plantas como se aclara en las tres columnas a la derecha de esta secuencia. El análisis se realizó por LGC Genomics, ver en www.lgcgenomics.com

SNP SEQ ID	Secuencia	Lactuca	Cichorium fértil	Cichorium CMS
1	CCGAACCGCGGAAATGGTCGCCCTATTACACGGCTCACTAACTCTGCCCTG[G/T] AGTGGTGGTACCTATTATTCGTCGGCGGGCGGTCCGGCGATAC	G	T	G
2	CTCTTAAGGTTAGTTCTATGCCCTCACAACAACCTACCTCATAGGTGATTCT[A/C]AA TCCGTCTTTAGATCAGAAAGTAGATGCCCTCTCCAGGGCTCTGT	A	C	A
3	GTACCAAATGCTTGGCAATCCTTGGTAGAGCTTATTTATGATTTTCGTGCT[G/T]AA CCTGGTAAACGAACAAATAGGGGCTTTCCGGAAATGTTAAA	T	G	T
4	TATTGATTACACTCCTTCTCCTACTGCTTCTCCTTATACCCACTAATGTT[A/C]TTC TTCGTCTACCTTGACATTGGGAAATTTCCATTTCGAGAAAG	C	A	C
5	TGCAGCGTAAACTCCTGCTAAATGAATGCCCTTGGCTTTGAAATTT[A/C]T GTTCTGATTCAACTCCTTCATGCCATTGATTGATGCAAGTCTT	A	C	A
6	CTGAATGACCTCTCTCATCTAATCGATCGGTGAAGGATGCTTTTGAAGAT[A/C]A TCTGGTCTGGCTCGTTACCATTAGTTCCTCTCTCTATAGTCGAG	A	C	A
7	CTCTTGTTCTCTTTTCTTAGTTAGGCCCAAGAAAGTACAAAGATATAGCTT[G/T]AC TAATATACTAAGATGATAGCTAGAGACTAGAGATGAGAGTGCA	G	T	G
8	TTGGATATTGTACGACAGGATCCCCATCCGTGTTTTTCGTTTCGCTAACGA[G/T]A AAGGCCGGAAGCGTGGGACCTATTTAAGTGACCTGGCCGATGG	G	T	G
9	TTTTTCGTTCTCTCTTCGATAAGAAATATCGATTTGAAATGATAAAAAAT[G/T]CCT CTTTATTCTCTTGCTCAGCGAAAAGAACTGCCCTAAGCATAC	G	T	G
10	GTCCGATCGTCGCTAGAGGCCCGCTGACTATAATACACTGTTTCGAAATTT[A/C]T TCGTTTCTGCCGAAACAAAACGGGATTGGCTATCTTAACCTTAG	A	C	A
11	AAGGAAATGATCTTTACATGGAAATGAAAGAATCTGGAGTAATTAATGAA[A/C]AA AATATCCAGAAATCAAAAAGTAGCTCTAGTTTACGGTCAGATGA	A	C	C

SNP SEQ ID	Secuencia	<i>Lactuca</i>	<i>Cichorium férti</i>	<i>Cichorium CMS</i>
12	GGGGCGTCCAAAGAGTCGATCATTTCTGCGTACTGTCGACT[A/G]CCCCCTTC CAATGGGTTTCGAAGATAAAAATCCTTTATTGGCCCAT	A	G	G
13	CATACGCTAAAAATTTGTCCCCTTTTAAATGCAATTTACCCCGCTGAACCTGG[A/G]G TTTTTGATGCATACAAGTATTTTGTGGAACTTGATACATAA	G	A	A
14	AGATAAAAATAACAAGGAATAGAAATTTGATTAGTTGGTATTCAAAAATATA[C/T]GA TTCAAGTAGTCAAGTCGAGAAAGAGATGGTTGAATCAAAATAA	T	C	C
15	TAAGCAATATATTGATTTTCTCTCCAGGAACAGGCTCGATTCATAGCA[G/T]C GCCCTTTGTAAACGATCAAGGCTCGTAAGTCCATCGGTCCACACA	T	G	G
16	ACTTTTATTGGCATTGGAAGCACATTACATTATGGCAGGGTAATGTTTC[A/G]CA GTTTAATGAATCTTCCACTTATTGATGGGCTGGTTAAGAGAT	G	A	A
17	GGTATGAATAGTTTATCAGTCTGGGCATGGATGTTTTTATTTGGACATCT[G/T]GT TTGGGCTACTGGATTTATGTTTTTAATTTCTGGCGTGGATAT	G	T	T

Ejemplo 11. Caracterización de los granos de polen

Para ilustrar la diferencia entre la planta de achicoria fértil original y las plantas fusionadas seleccionadas, se realizó un estudio de los granos de polen disponibles. Estudiando la planta fusionada seleccionada P153, fueron visibles granos de polen putativos, sin embargo, tanto un intento de auto-polinización como una tinción con acetato de fluoresceína (ejemplo 3) mostraron que este polen putativo no era funcional.

Ensayos adicionales del polen de *Cichorium* y de la planta fusionada seleccionada mostraron que los granos de polen de esta última eran significativamente menores. Los granos de polen, resuspendidos en WS9M se visualizaron mediante técnicas normalizadas de campo claro en un microscopio invertido con un objetivo con lente de 10 aumentos y se grabaron con una cámara CCD de 3 MB. Las imágenes digitales de los granos de polen se procesaron y analizaron con Image J (Ransband, W.S., Image J, U.S., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012).

Las imágenes se convirtieron a imágenes de binarias de 8 bit. Los huecos se cerraron, los valores atípicos negros se eliminaron (radio = 10 píxeles), y las proyecciones de los granos de polen que se tocaban entre sí se separaron mediante el comando "divisor" (watershed). Las imágenes resultantes se analizaron con el comando "análisis de partículas" (analyze particles) para obtener las áreas de superficie de las proyecciones de los granos de polen. Los objetos en contacto con el borde de la imagen fueron excluidos. Las medidas se convirtieron en μm^2 y se promediaron usando las funciones estadísticas de Microsoft Excel.

Para las plantas fusionadas seleccionadas la superficie polínica varió entre 1150 y 1850 μm^2 (desviación típica = 180), para los granos de polen de la planta de *Cichorium* original, la superficie estimada estuvo entre 1550 y 2550 μm^2 (desviación típica = 226). Más aún, el análisis de la *t* de Student indicó que la probabilidad de que ambas poblaciones de granos de polen sean iguales está por debajo de 0,01 (Figura 3).

Soluciones y reactivos

Si no se indica lo contrario todas las soluciones fueron tratadas en autoclave (20 minutos a 120°C).

	½ MS15	MS30	MS30-gelrite
Medio ½ MS Duchefa; M0233	2,28 g/l	-	-
Medio MS Duchefa; M0222	-	4,40 g/l	4,40 g/l
Sacarosa	15 g/l	30 g/l	30 g/l
Agar Duchefa; M1002	7 g/l	7 g/l	-
Gelrite Duchefa; G1101	-	-	7,5 g/l
pH	5,8	5,8	5,8

Medio WS9M

KH ₂ PO ₄	0,20 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mM
KNO ₃	1 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 mM
MES (monohidrato)	2,8 mM
Manitol	0,5 M
pH 5,6; 580 mOsm/kg	

ES 2 675 586 T3

Solución enzimática:

Medio WS9M enriquecido con:

Celulasa Yakult Onozuka R10	0,2% (p/v)
Pectinasa (Sigma, P4300) pH 5,6-5,7, esterilizada por filtración	0,2% (p/v)
pH 5,6-5,7, esterilizada por filtración	

Solución de lavado:

CaCl ₂ ·2H ₂ O	13,6 mM
KCl	0,34 M
MES (monohidrato)	2,8 mM
pH 5,8; 640 mOsm/kg	

5

Solución madre de IOA 60 mM:

0,222 g de IOA por 20 ml de solución de lavado

Solución de PEG1500:

PEG1500	40 % (p/v)
Glucosa anhidra (p/v)	0,3 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	50 mM
esterilizada por filtración	

10

Solución de dilución de PEG

Glicine	50 mM
glucosa anhidra	0,3 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	50 mM
pH 10,5; 520 mOsm/kg; esterilizada por filtración	

ES 2 675 586 T3

Solución CPW-Ca⁺⁺ de 200 ml

10 x madre de sales CPW (referencia 3)	20 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	50 mM
Manitol	0,365 M
pH 5,7; 530 mOsm/kg; esterilizada por filtración	

Medio de cultivo	PM1	PM2
KNO ₃	7,42 mM	-
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,69 mM	0,69 mM
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,5 mM	1,5 mM
KH ₂ PO ₄	0,62 mM	0,62 mM
KCl	-	5 mM
100x madre de B5 micro Gamborg ⁴	5 ml/l	5 ml/l
KI	0,73 µM	0,73 µM
FeNaEDTA	0,11 mM	0,11 mM
vitaminas B5 Gamborg (Duchefa; G0415)	11,2 mg/l	11,2 mg/l
Glutamina	2,57 mM	5,14 mM
Sacarosa	14,6 mM	14,6 mM
Manitol	0,41	0,30 M
NAA	10,2 µM	2,5 µM
BA	4,44 µM	-
Hidrolizado de Caseína (Duchefa; C1301)	-	150 mg/l
pH	5,5-5,6	5,5-5,6
Osmolaridad	530 mOsm/kg	400 mOsm/kg
	esterilizado por filtración	esterilizado por filtración

Medio CRM

Medio MS (Duchefa; M0222)	4,40 gram
Sacarosa	30 mM
Zeatina	4,56 μ M
BA	2,22 μ M
Hidrolizado de Caseína (Duchefa; C1301)	300 mg/l
agar (Duchefa; M1002)	8 g/l
pH 5,7	

Citrato de sodio 50 mM:

solución A, solución de alginato de sodio, medio B: referencia 5

5 Medio B5 Gamborg:

Mezcla para PCR:

Tris-HCl (pH 8,8)	75 mM
NH ₄ SO ₄	20 mM
Tween20	0,01% (v/v)
MgCl ₂	2,8 mM
dNTP	0,25 mM
Cebador directo	0,15 μ M
Cebador inverso	0,2 μ M
ADN Polimerasa Red Hot® (ABgene, Epsom U.K.)	0,04 unidades/ μ l
ADN genómico vegetal	~0,2 ng/ μ l

Tampón de trituración

Sorbitol	0,35 M
Manitol	0,1 M
Tris-HCl pH 7.6	50 mM
Na ₂ -EDTA	5 mM
BSA	0,2 % (w/v)

ES 2 675 586 T3

PVP	1,0 % (w/v)
Espermidina	0,025 % (w/v)
β mercaptoetanol	0,125 % (v/v)
DIECA	10 mM

Tampón de almacenamiento de ADNasa

Acetato de sodio	5 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 M
pH 4,5 usando ácido acético;	
antes de su uso, se añade un volumen igual de glicerol	

Tampón de ADNasa (DB) (4°C)

DIECA (añadir inmediatamente antes de su uso)	10 mM
---	-------

5

Tampón de conservación

Sacarosa	0,6 M
Tris HCl pH 7,2	10 mM
Na ₂ -EDTA	20 mM
DIECA (añadir inmediatamente antes de su uso)	10 mM

Tampón TE

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Na ₂ -EDTA	10 mM

5 mg/ml de ADNasa en tampón de almacenamiento de ADNasa
MgCl ₂ 2 M
Proteinasa K
Solución de ARNasa: Thermo Scientific producto número EN0551 5 M en acetato de potasio
Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)
Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)

Acetato de amonio 7,5 M
Acetato de sodio 7,5 M pH 4,5-5,2

Abreviaturas:

	BA:	6-benzil-aminopurina
	bp:	pares de bases
5	BSA:	albúmina sérica bovina
	CMS:	con esterilidad masculina citoplásmica esterilidad masculina citoplásmica
	DIECA:	Dietilditiocarbamato de sodio
	EDTA:	ácido etilén diaminotetraacético
10	FDA:	fluoresceína diacetato
	IOA:	yodoacetamida
	IA:	yodoacetato
	MES:	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
	mtDNA:	ADN mitocondrial
15	NAA:	ácido 1-naftalenoacético
	ng:	nanogramo
	PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
	PEG:	polietilenglicol
	PVP:	polivinilpirrolidona
20	RAMP:	polimorfismos de microsatélites amplificados al azar
	SD:	desviación típica
	SNP:	polimorfismo de un solo nucleótido
	K:	G o T)
	M:	A o C) códigos de ambigüedad de nucleótidos
25	R:	G o A) según las reglas de la IUPAC
	Y:	T o C)

Listado de secuencias

30	<110>	Bejo Zaden B.V.
	<120>	PLANTA CITOPLASMÁTICA CICHORIUM MASCULINA
	<130>	4/2OL49/18
35	<160>	38
	<170>	BiSSAP 1.0

```

<210> 1
<211> 96
<212> ADN
<213> Lactuca
5
<220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
10
<400> 1

ccgaaccgog cgaaatgggc gccattaca cggctcacta actctgcctg gagtgggtgt
60

acctattatt cgtcggcggg ggcggtccgg cgatac
96

15 <210> 2
<211> 96
<212> ADN
<213> Lactuca

20 <220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

25 <400> 2

ctcttaaggt tagttctatg cctcacaaca actacctcat aggtgattct aaatccgtct
60

ttagatcaga agtagatgcc tcttcagggt ctctgt
96

30 <210> 3
<211> 96
<212> ADN
<213> Lactuca

<220>
35 <221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 3
40 gtaccaaata cttggcaatc cttggtagag cttatttatg atttcgtgct taacctggtg
60

aacgaacaaa taggggggtct ttccggaaat gttaaa
96

45 <210> 4
<211> 96
<212> ADN
<213> Lactuca

<220>

```

<221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 5 <400> 4
 tattgattac actccttctc ctactgcttc tccttatacc cactaatgtt cttcttcgtc
 60
 ctaccttgac tattgggaaa tttccattcg agaaag
 96
 10 <210> 5
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Lactuca
 <220>
 15 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 <400> 5
 20 tgcagcgtaa actcctgcta aatgaatgcc ttgctttgg ctttgaaatt atgttcctga
 60
 ttcaactcct tcatgccatt gattgatgca agtctt
 96
 <210> 6
 <211> 96
 25 <212> ADN
 <213> Lactuca
 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 <400> 6
 ctgaatgacc tctctcatct aatcgatcgg tgaaggatgt ctttgaagat aatctgggtc
 60
 ggctcgttac cattagttcc tctctctata gtcgag
 35 96
 <210> 7
 <211> 96
 <212> ADN
 40 <213> Lactuca
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 45 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 <400> 7

ES 2 675 586 T3

ctcttggtct cttttcttag ttaggcccaa gaaagtacaa gatatagctt gactaatata
60

ctaagatgat agctagagac tagagatgag agtgca
96

<210> 8
<211> 96
<212> ADN
<213> Lactuca

<220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 8

ttggatattg tacgacagga tccccatccg tgttttcggt tcgctaacga gaaaggccgg
60

aaagcgtggg acctatttaa gtgacctggc cgatgg
96

<210> 9
<211> 96
<212> ADN
<213> Lactuca

<220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 9

tttttcgttc cttctcttcg ataagaatat cgatttgaaa tgataaaaat gcctctttat
60

tctcttggtc tcagcgaaa gaaactgctaa gcatac
96

<210> 10
<211> 96
<212> ADN
<213> Lactuca

<220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 10

gtccgatcgt cgctagaggg ccgtcgacta taatacactg ttcgaaattt attcgtttct
60

gccgaaacaa aacgggattg gctatcttaa ccttag
96

```

5  <210> 11
    <211> 96
    <212> ADN
    <213> Lactuca

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..96
10  <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

    <400> 11

    aaggaaatga tctttacatg gaaatgaaag aatctggagt aattaatgaa maaaatattc
    60

    cagaatcaaa agtagctcta gtttacggtc agatga
    96
15  <210> 12
    <211> 96
    <212> ADN
    <213> Lactuca

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..96
20  <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

    <400> 12

    gggggcgtcca aagagtcgat cattttctgca tgattttttt ctctgtgcact rcccttcca
    60

    atgggtttcg aagataaaaa tcctttattg gcccat
    96
30  <210> 13
    <211> 96
    <212> ADN
    <213> Lactuca

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..96
35  <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

    <400> 13

    catacgctaa aatttgtccc tttttaatgc atttaccctg ctgaacctgg rgtttttgat
    60

    gcatacaagt atttttgttg gaacgttgat acataa
    96
45  <210> 14
    <211> 96
    <212> ADN
    <213> Lactuca

```

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 5
 <400> 14
 agataaaaaat aacaaggaat agaatttgat tagttggtat tcaaaatata ygattcaagt
 60
 agtcaagtcg agaaagagat ggttgaatca aaataa
 96
 10 <210> 15
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Lactuca
 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 20 <400> 15
 taagcaatat attgattttc ttctccagga acaggctcga tcccatagca kcgccctttg
 60
 taacgatcaa ggctcgtaag tccatcggtc cacaca
 96
 25 <210> 16
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Lactuca
 30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 35 <400> 16
 actttttatt ggcattggaa gcacattaca ttatggcagg gtaatgtttc rcagtttaat
 60
 gaatcttcca cttatttgat gggctgggta agagat
 96
 40 <210> 17
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Lactuca
 45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 <400> 17

ES 2 675 586 T3

ggatatgaata gtttatcagt ctgggcatgg atgtttttat ttggacatct kgtttgggct
60

actggattta tgtttttaaat ttccctggcgt ggatat
96

5 <210> 18
<211> 96
<212> ADN
<213> Cichorium

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

15 <400> 18
ccgaaccgcg cgaaatggtc gctattaca cggctcacta actctgcctg tagtggtggt
60

acctattatt cgtcggcggg ggcgggccgg cgatac
96

20 <210> 19
<211> 96
<212> ADN
<213> Cichorium

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

<400> 19
ctcttaagggt tagttctatg cctcacaaca actacctcat aggtgattct caatccgtct
60

30 ttagatcaga agtagatgcc tcttcagggt ctctgt
96

35 <210> 20
<211> 96
<212> ADN
<213> Cichorium

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

<400> 20

ES 2 675 586 T3

gtaccaaatag cttggcaatc cttggtagag cttatttatg atttcgtgct gaacctggta
60

aacgaacaaa tagggggtct ttccggaat gttaaa
96

5 <210> 21
<211> 96
<212> ADN
<213> Cichorium

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

<400> 21
tattgattac actccttctc ctactgttc tccttatacc cactaatgtt attcttcgtc
60

15 ctaccttgac tattgggaaa ttccattcg agaaag
96

<210> 22
<211> 96
<212> ADN
20 <213> Cichorium

<220>
<221> fuente
<222> 1..96
25 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

<400> 22
tgcagcgtaa actcctgcta aatgaatgcc ttgctttgg ctttgaaatt ctgttctga
60

30 ttcaactcct tcatgccatt gattgatgca agtctt
96

<210> 23
<211> 96
<212> ADN
35 <213> Cichorium

<220>
<221> fuente
<222> 1..96
40 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

<400> 23
ctgaatgacc tctctcatct aatcgatcgg tgaaggatgt ctttgaagat catctggctt
60

ggctcgttac cattagtcc tctctctata gtcgag
96

```

<210> 24
<211> 96
<212> ADN
5 <213> Cichorium

<220>
<221> fuente
<222> 1..96
10 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

<400> 24

ctcttggtct cttttcttag ttaggcccaa gaaagtacaa gatatagctt tactaatata
60

ctaagatgat agctagagac tagagatgag agtgca
96
15 <210> 25

<400> 25

20 000

<210> 26
<211> 96
<212> ADN
25 <213> Cichorium

<220>
<221> fuente
<222> 1..96
30 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

<400> 26

ttggatattg tacgacagga tcccatccg tgttttcgtt tcgctaacga taaaggccgg
60

aaagcgtggg acctatttaa gtgacctggc cgatgg
96
35 <210> 27
<211> 96
<212> ADN
<213> Cichorium

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

45 <400> 27

ttttcgttc cttctcttcg ataagaatat cgatttgaaa tgataaaaat tcctctttat
60

tctcttggtgc tcagcgaaag aactgcctaa gcatac
96

```

```

<210> 28
<211> 96
<212> ADN
5 <213> Cichorium

<220>
<221> fuente
<222> 1..96
10 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

<400> 28

gtccgatcgt cgctagaggc cgcgcgacta taatacactg ttcgaaattt cttcgtttct
60

gccgaaacaa aacgggattg gctatcttaa ccttag
15 96

<210> 29
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencias artificiales
20

<220>
<221> fuente
<222> 1..22
25 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 29

gcctccaggg tatgatcctt aa
22

30 <210> 30
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencias artificiales

35 <220>
<221> fuente
<222> 1..22
<223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"

40 <400> 30

cgagcactta tttgacctgt gt
22

45 <210> 31
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencias artificiales

<220>
50 <221> fuente
<222> 1..21
<223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 31
55 tgctaacgag gttcaatgat g

21

```

```

5      <210> 32
      <211> 22
      <212> ADN
      <213> secuencias artificiales

      <220>
      <221> fuente
      <222> 1..22
10     <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"

      <400> 32

      ttcgattcag gatcaagccc ag
      22
15
      <210> 33
      <211> 22
      <212> ADN
      <213> secuencias artificiales
20
      <220>
      <221> fuente
      <222> 1..22
      <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"
25
      <400> 33

      tcgatattct tttcgcgaca gg
      22
30
      <210> 34
      <211> 22
      <212> ADN
      <213> secuencias artificiales
35
      <220>
      <221> fuente
      <222> 1..22
      <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"
40
      <400> 34

      ttaggttatt tcgttggtcg cc
      22
45
      <210> 35
      <211> 22
      <212> ADN
      <213> secuencias artificiales

      <220>
      <221> fuente
      <222> 1..22
      <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"
50
      <400> 35

      tttatagaca ggcactccct cc
      22
55
      <210> 36
      <211> 22
      <212> ADN
60

```

<213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 36

acctgaaggg agttatggca tt

10 22

<210> 37
 <211> 10
 <212> ADN
 15 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..10
 20 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador RAPD" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 37

agtcgggtgg

25 10

<210> 38
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

30 30

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..16
 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador iSSR" /organismo="secuencias artificiales"

35 35

<400> 38

ccaggtgtgt gtgtgt

16

40 **Sequence listing**

<110> Bejo Zaden B.V.

<120> PLANTA CITOPLASMÁTICA CICHORIUM MASCULINA

45 <130> 4/2OL49/18

<160> 38

50 <170> BiSSAP 1.0

<210> 1
 <211> 96
 <212> ADN
 55 <213> Lactuca

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 60 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 1

```

ccgaaccgcg cgaaatggtc gcctattaca cggtcacta actctgcctg gagtgggtgt 60
acctattatt cgtcggcggg ggcgggccgg cgatac 96

<210> 2
5 <211> 96
  <212> ADN
  <213> Lactuca

<220>
10 <221> fuente
   <222> 1..96
   <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 2
15 ctcttaaggt tagttctatg cctcacaaca actacctcat aggtgattct aaatccgtct 60
   ttagatcaga agtagatgcc tcttcagggt ctctgt 96

<210> 3
20 <211> 96
   <212> ADN
   <213> Lactuca

<220>
25 <221> fuente
   <222> 1..96
   <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 3
   gtaccaaatg cttggcaatc cttggtagag cttatttatg atttcgtgct taacctggta 60
30 aacgaacaaa taggggggtct ttccggaaat gttaa 96

<210> 4
35 <211> 96
   <212> ADN
   <213> Lactuca

<220>
40 <221> fuente
   <222> 1..96
   <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 4
   tattgattac actccttctc ctactgcttc tccttatacc cactaatgtt cttcttcgtc 60
45 ctaccttgac tattgggaaa tttccattcg agaaag 96

<210> 5
   <211> 96
   <212> ADN
   <213> Lactuca
50

<220>
   <221> fuente
   <222> 1..96
   <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
55

<400> 5

```

	tcgcagcgtaa actcctgcta aatgaatgcc tttgotttgg ctttgaaatt atgttctga	60
	ttcaactcct tcatgccatt gattgatgca agtctt	96
5	<210> 6 <211> 96 <212> ADN <213> Lactuca	
10	<220> <221> fuente <222> 1..96 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"	
	<400> 6	
	ctgaatgacc tctctcatct aatcgatcgg tgaaggatgt ctttgaagat aatctggtct	60
15	ggctcgttac cattagttcc tctctctata gtcgag	96
20	<210> 7 <211> 96 <212> ADN <213> Lactuca	
25	<220> <221> fuente <222> 1..96 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"	
	<400> 7	
	ctcttgttct cttttcttag ttaggcccaa gaaagtacaa gatatagctt gactaatata	60
30	ctaagatgat agctagagac tagagatgag agtgca	96
35	<210> 8 <211> 96 <212> ADN <213> Lactuca	
40	<220> <221> fuente <222> 1..96 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"	
	<400> 8	
	ttggatattg tacgacagga tccccatccg tgttttcgtt tcgctaacga gaaaggccgg	60
	aaagcgtggg acctatttaa gtgacctggc cgatgg	96
45	<210> 9 <211> 96 <212> ADN <213> Lactuca	
50	<220> <221> fuente <222> 1..96 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"	
55	<400> 9	
	tttttcgttc cttctcttcg ataagaatat cgatttgaaa tgataaaaat gcctctttat	60
	tctcttgtgc tcagcgaaag aactgcctaa gcatac	96

<210> 10
 <211> 96
 <212> ADN
 5 <213> Lactuca

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 10 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

 <400> 10

 gtccgatcgt cgctagaggc ccgtcgcacta taatacactg ttcgaaattt attcgtttct 60
 gccgaaacaa aacgggattg gctatcttaa ccttag 96
 15
 <210> 11
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Lactuca
 20
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 25
 <400> 11

 aaggaaatga tctttacatg gaaatgaaag aatctggagt aattaatgaa maaaatattc 60
 cagaatcaaa agtagctcta gtttacggtc agatga 96
 30
 <210> 12
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Lactuca
 35
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 40
 <400> 12

 ggggcgtcca aagagtcgat catttctgca tgattttttt ctcgtagcact rccccttcca 60
 atgggtttcg aagataaaaa tcctttattg gcccat 96
 45
 <210> 13
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Lactuca
 50
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"
 55
 <400> 13

 catacgctaa aatttgtccc tttttaatgc atttaccgct ctgaacctgg rgtttttgat 60
 gcatacaagt atttttgttg gaacgttgat acataa 96

 <210> 14
 <211> 96

<212> ADN
 <213> Lactuca

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 14

10 agataaaaaat aacaaggaat agaatttgat tagttggtat tcaaaatata ygattcaagt 60
 agtcaagtcg agaaagagat ggttgaatca aaataa 96

<210> 15
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Lactuca

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 15

20 taagcaatat attgattttc ttctccagga acaggctcga ttccatagca kcgccctttg 60
 25 taacgatcaa ggctcgtaag tccatcggtc cacaca 96

<210> 16
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Lactuca

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 16

35 actttttatt ggcattggaa gcacattaca ttatggcagg gtaatgtttc rcagtttaat 60
 40 gaatcttcca cttatttgat gggctggtta agagat 96

<210> 17
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Lactuca

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Lactuca"

<400> 17

45 ggtatgaata gtttatcagt ctgggcatgg atgtttttat ttggacatct kgtttgggct 60
 50 actggattta tgtttttaat ttctctggcgt ggatat 96

<210> 18
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Cichorium

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"
 5 <400> 18

 ccgaaccgcg cgaaatggtc gcctattaca cggtcacta actctgcctg tagtggtggt 60
 acctattatt cgtcggcggg ggcggtcogg cgatac 96
 10
 <210> 19
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Cichorium
 15
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"
 20 <400> 19

 ctcttaaggt tagttctatg cctcacaaca actacctcat aggtgattct caatccgtct 60
 ttagatcaga agtagatgcc tcttccaggg ctctgt 96
 25
 <210> 20
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Cichorium
 30
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"
 35 <400> 20

 gtaccaaagtg cttggcaatc cttggtagag cttatttatg atttcgtgct gaacctggta 60
 aacgaacaaa taggggtctt ttccggaaat gttaaa 96
 40
 <210> 21
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Cichorium
 45
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"
 <400> 21
 50
 tattgattac actccttctc ctactgcttc tccttatacc cactaatgtt attcttcgtc 60
 ctaccttgac tattgggaaa tttccattcg agaaag 96
 55
 <210> 22
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Cichorium
 60
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

<400> 22

tgacagcgtaa actcctgcta aatgaatgcc tttgctttgg ctttgaaatt ctgttcctga 60

ttcaactcct tcatgccatt gattgatgca agtcctt 96

5 <210> 23
<211> 96
<212> ADN
<213> Cichorium

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

15 <400> 23

ctgaatgacc tctctcatct aatcgatcgg tgaaggatgt ctttgaagat catctggctct 60

ggctcgttac cattagttcc tctctctata gtcgag 96

20 <210> 24
<211> 96
<212> ADN
<213> Cichorium

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

30 <400> 24

ctcttgttct cttttcttag ttaggcccaa gaaagtacaa gatatagctt tactaatata 60

ctaagatgat agctagagac tagagatgag agtgca 96

35 <210> 25
<400> 25

000

40 <210> 26
<211> 96
<212> ADN
<213> Cichorium

45 <220>
<221> fuente
<222> 1..96
<223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"

50 <400> 26

ttggatattg tacgacagga tccccatcgg tgttttcggt tcgctaacga taaaggccgg 60

aaagcgtggg acctatttaa gtgacctggc cgatgg 96

55 <210> 27
<211> 96
<212> ADN
<213> Cichorium

<220>

<221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"
 5 <400> 27
 tttttcgttc cttctcttcg ataagaatat cgatttgaaa tgataaaaaat tcctctttat 60
 tctcttgtgc tcagcgaaaag aactgcctaa gcatac 96
 <210> 28
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Cichorium
 10
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..96
 <223> /mol_tipo="ADN" /organismo="Cichorium"
 15
 <400> 28
 20 gtccgatcgt cgctagaggc ccgtcgacta taatacactg ttcgaaattt cttcgtttct 60
 gccgaaacaa aacgggattg gctatcttaa ccttag 96
 <210> 29
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales
 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"
 <400> 29
 35 gcctccaggg tatgatcctt aa 22
 <210> 30
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> secuencias artificiales
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 45 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"
 <400> 30
 cgagcactta ttgacctgt gt 22
 50
 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales
 55
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"
 60
 <400> 31

tgctaacgag gttcaatgat g 21

<210> 32
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 32

15 ttcgattcag gatcaagccc ag 22

<210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 25 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 33

30 tcgatattct ttctcgaca gg 22

<210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"

40 <400> 34

ttaggtatt tcgtggtcg cc 22

45 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"

55 <400> 35

tttatagaca gcgactccct cc 22

60 <210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

65 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22

```

<223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 36

5  acctgaaggg agttatggca tt      22

    <210> 37
    <211> 10
    <212> ADN
10  <213> secuencias artificiales

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..10
15  <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador RAPD" /organismo="secuencias artificiales"

    <400> 37

    agtcgggtgg      10
20

    <210> 38
    <211> 16
    <212> ADN
    <213> secuencias artificiales
25

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..16
    <223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador iSSR" /organismo="secuencias artificiales"
30

    <400> 38

    ccaggtgtgt gtgtgt      16
35

```

REIVINDICACIONES

1. Una planta *Cichorium* con esterilidad masculina citoplásmica que comprenden mitocondria de *Lactuca*, en donde dicha mitocondria de *Lactuca* comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos mitocondriales seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, y en donde dicha planta de *Cichorium* comprende un citoplasma maternalmente obtenido a partir de una planta según el depósito NCIMB 42125.
2. La planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática según la reivindicación 1, en donde dicha planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática es identificable además por un marcador molecular de 1592 bp usando la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 32.
3. La planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática según la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática es identificable además por un marcador molecular de 293 bp usando la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 34.
4. La planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha al menos una secuencia de ácidos nucleicos mitocondriales es al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o diez secuencias de ácidos nucleicos mitocondriales.
5. La planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha planta de *Cichorium* se selecciona del grupo que consiste en achicoria verde, achicoria italiana roja, achicoria de hoja roja, Treviso, achicoria blanca, pan de azúcar, endivia Belga, achicoria de hoja blanca, achicoria Catalana, *C. intybus* var. *foliosum*, *C. endivia*, y *C. intybus* var. *sativum*.
6. Un método para identificar una planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática, donde dicho método comprende determinar en una muestra de dicha planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática una o más secuencias de ácidos nucleicos mitocondriales seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.
7. Un método para identificar una planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática, donde dicho método comprende determinar en una muestra de dicha Planta de *Cichorium* con esterilidad masculina citoplasmática un marcador molecular de 1592 bp usando los cebadores de amplificación de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 32 y/o un marcador molecular de 293 bp usando los marcadores de amplificación de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34.

Figura 1

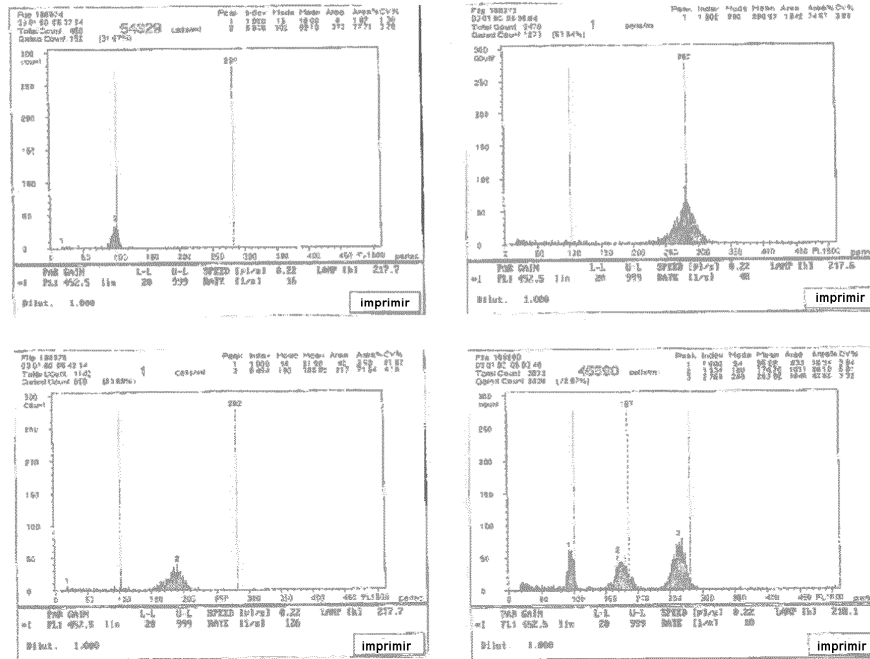


Figura 2

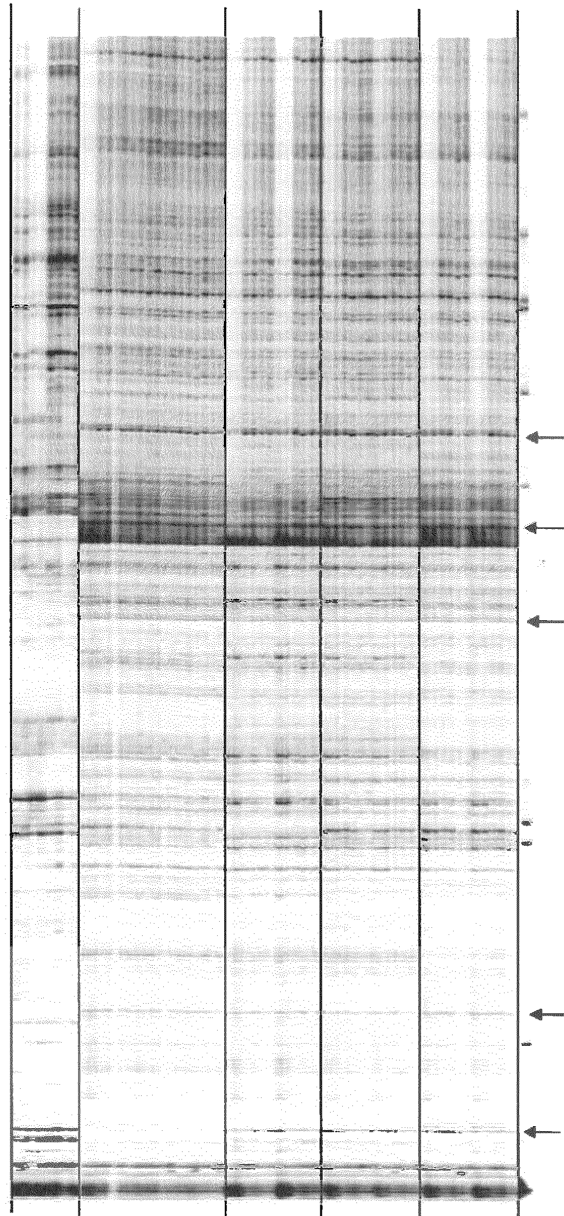


Figura 3

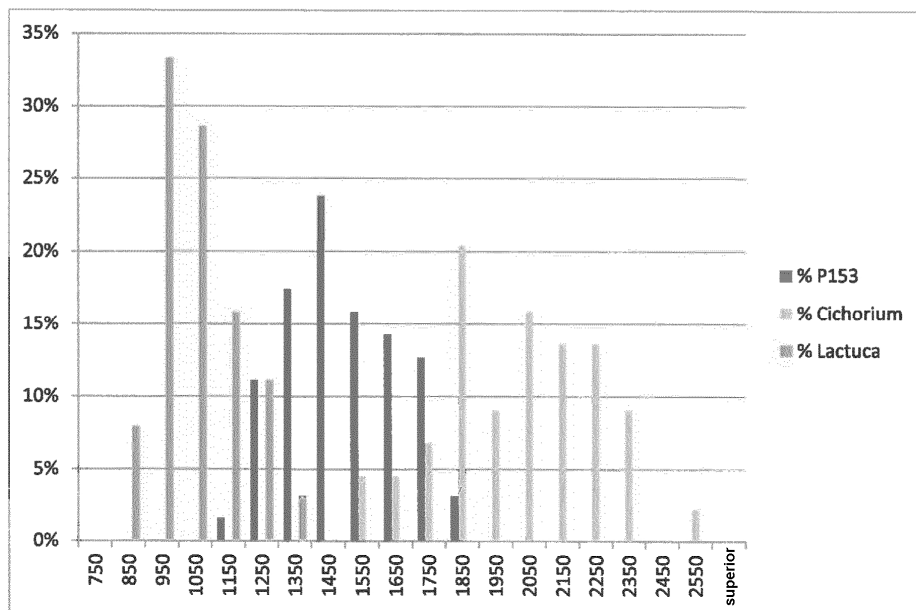


Figura 4



Figura 5

