

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 921**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2010 PCT/EP2010/063761**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2011 WO11036108**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2010 E 10755162 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2480065**

54 Título: **Nuevas plantas de brassica resistentes a enfermedades**

30 Prioridad:

22.09.2009 EP 09171021

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

04.02.2020

73 Titular/es:

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)

Westeinde 62

NL-1601 BK Enkhuizen, CH

72 Inventor/es:

LINDERS, ENRICO GERARDUS ALBERTUS;

WIJNKER, THAAM;

BRIGGS, WILLIAM y

VAN DER PLOEG, SJAAK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 739 921 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

Nuevas plantas de *brassica* resistentes a enfermedades

La presente divulgación se refiere a nuevas plantas resistentes a *Albugo candida* y a las semillas de dichas plantas. La divulgación también se refiere a métodos para hacer este tipo de plantas y para producir semillas de las mismas.
 5 La invención está dirigida a marcadores y al uso de los mismos para identificar el rasgo de resistencia a *Albugo candida*.

Albugo candida (sin.: *A. cruciferum*, también denominada roya blanca) o *Albugo candida* se produce en todas las partes del mundo en donde se cultivan cultivos de crucíferas.

Albugo candida es una enfermedad generalizada que provoca serios problemas en muchas áreas de cultivo de *Brassica*.
 10 *Brassica*.

La roya blanca ocurre más comúnmente en: mostaza de campo (*Brassica campestris* L.), mostaza de hoja o china (*B. juncea* Zerj, y Coss.), mostaza negra (*B. nigra* (L.) Koch), brócoli (*B. oleracea* L. var. *italica* L.), coliflor (*B. oleracea* L. var. *botrytis* L.), repollo (*B. oleracea* L. var. *capitata* L.), coles de Bruselas (*B. oleracea* L. var. *gemmifera* DC), repollo chino o apio (*B. pekinensis* (Lour.) Rupr.), colinabo (*B. campestris* L. var. *napo* *Brassica* (L.) DC.), pak-
 15 choi (*B. chinensis* L.), nabo (*B. rapa* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.) y daikon (*R. sativus* L. var. *longipinnatus* Bailey).

Los esporangios se producen en pústulas y, una vez liberados, son dispersados por el viento, la lluvia o insectos a plantas vecinas. Los esporangios requieren algo de secado para germinar bien. Cada uno de los esporangios en germinación da lugar a cinco a siete zoosporas. La temperatura preferida para la germinación varía de 1 a 18 °C, pero es óptima entre 10 y 14 °C. Las temperaturas deberían estar entre 16 y 25 °C, siendo la temperatura óptima de 20 °C para que las zoosporas produzcan tubos de gérmenes y penetren en el tejido vegetal. La humedad necesaria para la actividad de las zoosporas es ideal cuando se encuentra en forma de rocío o niebla fuertes o durante períodos de lluvias prolongadas y temperaturas bajas. (*Vanterpool, T.C. 1959. Oospore germination in Albugo candida. Can. J. Bot. 37:169-172.*). Aunque *A. candida* muestra especialización para huéspedes específicos, la enfermedad parece desarrollarse en condiciones similares a lo largo de una amplia gama de aislados y huéspedes (Gilljamse et al., 2004, Spencer, Philips y Jeger (eds.), *Advances in Downy mildew Research*, Vol. 2, págs.107-118).
 20
 25

A diferencia de otros cultivos de *Brassica*, las oosporas parecen no desempeñar un papel importante en la epidemiología de los cultivos de *B. oleracea*, ya que aún no se ha informado de las oosporas. La reproducción asexual y la supervivencia de los esporangios en la producción de cultivos de *B. oleracea* durante todo el año no requiere que se formen oosporas para sobrevivir durante los períodos libres de cultivo. (Gilljamse et al., 2004, Spencer, Philips y Jeger (eds.), *Advances in Downy mildew Research*, Vol. 2, págs.107-118).
 30

Santos proyectó más de 30 accesos de *Brassica oleracea* para la resistencia a la enfermedad de *Albugo candida* (*Proc. Int. Symp. Brassica s. Ninth Crucifer Genetics Workshop. Acta Hort. 407. ISHS 1996*). Sus conclusiones son que la mayoría de lo accesos mostraron susceptibilidad y entre los accesos testados, una o dos especies silvestres de *Brassica oleracea* var. *costada* podría consistir en una fuente de resistencia a explorar y mejorar. En 2004, Santos y Dias seleccionaron una colección básica de 400 accesos que representa la diversidad genética y geográfica de *B. oleracea*. De nuevo, se encontró una gran variabilidad de reacciones entre y dentro de los accesos de la colección básica. Nueve accesos presentaron 50-78% de plántulas resistentes y podrían considerarse como fuentes potenciales para los programas de mejora de la resistencia a la roya blanca (*Genetic Resources and Crop Evolution 51: 713-722, 2004*).
 35
 40

La gestión de plagas implica medidas preventivas y curativas que incluyen tratamiento químico. El arado o cultivo con discos de plantas y partes de plantas enfermas da como resultado una rápida descomposición de los tejidos infectados y ayuda a reducir significativamente la futura infección por roya blanca. La rotación de cultivos con plantas huésped no crucíferas también es efectiva. El control de malas hierbas y otros métodos sanitarios también son necesarios.
 45

La resistencia se ha estudiado y se ha desplegado con éxito con mostaza y colinabo, sin embargo, con especies de *Brassica oleracea* cultivadas, tales como el brócoli, la col blanca, las coles de Bruselas y similares, esta resistencia aún no ha sido identificada.

El desarrollo del fungicida de acilalanina metalaxil (Ridomil®) mejoró la capacidad de controlar la roya blanca con la aplicación de fungicidas. Metalaxil proporciona una actividad curativa limitada y un cierto control de la infección sistémica.
 50

Las aplicaciones deberían hacerse en el suelo y posteriormente aplicarse al follaje. La frecuencia de aplicación variaría de acuerdo con la longitud del cultivo y la cantidad de precipitaciones experimentada. En ambientes templados, se sugiere una aplicación en el suelo y un mínimo de 1-2 aplicaciones foliares durante el ciclo de cultivo. En el campo, este hongo es difícil de controlar porque provoca infecciones que permanecen latentes en el campo y se convierten en descomposición de la fruta durante el almacenamiento posterior a la cosecha. No son infrecuentes
 55

pérdidas de cosechas de hasta el 50%. Las estrategias para controlar *Albugo candida* están limitadas por la aparición de cepas que son resistentes a uno o varios grupos de fungicidas. La mayoría de los fungicidas son protectores en su acción y no suprimirán una infección establecida, lo que limita el control efectivo a las aplicaciones de fungicida antes de la cosecha.

5 Por lo tanto, una buena resistencia genética del cultivo es importante para su protección contra la enfermedad.

Por lo tanto, hubo una necesidad largamente sentida e insatisfecha de estrategias convenientes, eficientes y económicamente sostenibles para proteger especies de *Brassica* especialmente las especies cultivadas de *Brassica oleracea* contra la infestación por *Albugo candida*. Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha de plantas cultivadas de *B. oleracea* con una resistencia mejorada a *Albugo candida*, en donde la resistencia también es fácil de criar y transferir a *Brassica* comercial, particularmente líneas de *Brassica oleracea*.

10 La presente divulgación aborda esta necesidad, proporcionando una planta de *Brassica*, particularmente una planta de *Brassica oleracea*, y más particularmente una planta de *Brassica oleracea* cultivada, que es resistente a *Albugo candida* y, por lo tanto, está protegida frente a los daños provocados por este patógeno. La provisión de plantas de *Brassica* resistentes a *Albugo candida*, especialmente plantas de *Brassica oleracea*, es una alternativa respetuosa con el medio ambiente para el uso de plaguicidas y puede aumentar la eficiencia de las opciones de control biológico y contribuir al éxito de los programas de gestión integrada de plagas.

15 El problema técnico que subyace a la presente divulgación es, por lo tanto, la provisión de una planta de *Brassica* cultivada resistente a *Albugo candida*, particularmente una planta cultivada de *Brassica oleracea*, que muestra resistencia a este patógeno.

20 El problema técnico está resuelto. Además, se ha encontrado ahora que el vínculo entre los genes responsables de los cambios morfológicos no deseados en la planta y el gen responsable de la resistencia a *Albugo candida*, tal como está presente en el material fuente de tipo salvaje, podría romperse y, por lo tanto, ya no está presente en la planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con la divulgación.

25 Por consiguiente, la presente divulgación aborda el problema, no satisfecho, de la resistencia a la enfermedad por *Albugo candida* en *Brassica oleracea* cultivada. Para lograr una mejor resistencia a la enfermedad en *Brassica oleracea* cultivada, la presente divulgación describe la transferencia de un determinante genético responsable de resistencia semi-dominante monogénica a *Albugo candida* de una fuente silvestre de la especie *Brassica* no domesticada, tal como la col rizada, por ejemplo, a diferentes especies cultivadas de *B. oleracea*, tales como la col blanca, el brócoli, la coliflor y las coles de Bruselas, por ejemplo.

30 La resistencia a *Albugo candida* puede transferirse mediante hibridación, seguida de repetidos retrocruzamientos y ensayos de enfermedades en todas las generaciones de retrocruzamientos. Se obtiene un alto nivel de resistencia a *Albugo candida* en las plantas cultivadas de *B. oleracea* resultantes. La resistencia es estable, y puede transmitirse a generaciones posteriores y transferirse a plantas cultivadas de *B. oleracea* susceptibles o menos resistentes.

35 Por lo tanto, la presente divulgación describe plantas cultivadas de *Brassica oleracea* resistentes a *Albugo candida*, en donde la resistencia a *Albugo candida* es monogénica y semi-dominante, incluyendo semillas y materiales de dichas plantas cultivadas y la progenie de las mismas. La presente divulgación también describe métodos para producir plantas de *Brassica oleracea* cultivadas, resistentes a *Albugo candida*, métodos para transferir la resistencia de *Albugo candida* a plantas de *Brassica oleracea* cultivadas susceptibles o menos resistentes. La presente invención se refiere a marcadores moleculares ligados a la resistencia a *Albugo candida*.

40 En un 1^{er} aspecto, la divulgación se refiere a una planta de *Brassica oleracea* cultivada resistente a *Albugo candida*, que comprende un locus de resistencia, estando vinculado dicho locus a un determinante genético obtenible del genoma de una planta silvestre de *Brassica oleracea*.

45 En un aspecto, la divulgación se refiere a una planta de *Brassica oleracea* cultivada resistente a *Albugo candida*, en donde el determinante genético unido al locus de resistencia a *Albugo candida* es un locus de resistencia a *Albugo candida* cualitativo.

En un aspecto adicional, la planta de acuerdo con la presente divulgación es una planta de *Brassica oleracea* cultivada resistente a *Albugo candida* que comprende un locus de resistencia, en el que el locus de resistencia está situado en el cromosoma 2.

50 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, en donde el locus de resistencia a *Albugo candida* está vinculado genéticamente a al menos un locus marcador, que se co-segrega con el rasgo de resistencia de *Albugo candida* y comprende un marcador que puede identificarse en una reacción PCR mediante la amplificación de un fragmento de ADN con un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR representados por un cebador directo de SEQ ID N° 1 y un cebador inverso de SEQ ID N° 2 o cualquier otro marcador situado en el cromosoma 2 que esté correlacionado estadísticamente y esté vinculado genéticamente con el rasgo de resistencia a *Albugo candida*.

La presente divulgación también se refiere a una planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende al menos un alelo o parte del mismo en un locus de rasgo cualitativo en el genoma de *Brassica oleracea* que contribuye a la resistencia a *Albugo candida*, que está genéticamente vinculada a al menos un locus marcador que co-segrega con el rasgo de resistencia a *Albugo candida* y comprende un marcador que puede identificarse en una reacción PCR mediante la amplificación de un fragmento de ADN con un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR representados por un cebador directo de SEQ ID N° 1 y un cebador inverso de SEQ ID N° 2, o cualquier otro marcador situado en el cromosoma 2 que esté correlacionado estadísticamente y genéticamente vinculado con el rasgo de resistencia a *Albugo candida*.

En un aspecto particular, la divulgación concierne a una planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con aspectos previos, en donde el par de cebadores amplifica un fragmento de ADN que comprende al menos un locus marcador que se co-segrega con el locus de resistencia a *Albugo candida*.

Más particularmente, la divulgación concierne a una planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con aspectos previos, en donde el par de cebadores amplifica un fragmento de ADN que comprende al menos un SNP dentro de al menos un locus marcador que se co-segrega con el locus de resistencia a *Albugo candida*.

Más particularmente, el al menos un SNP, dentro del al menos un locus marcador que se co-segrega con el locus de resistencia a *Albugo candida*, se selecciona dentro del grupo que comprende:

- i. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos T a C en la posición 134 en el producto amplificado por PCR
- ii. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos C a T en la posición 108 en el producto amplificado por PCR
- iii. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos T a C en la posición 366 en el producto amplificado por PCR

En SNP A, C corresponde a alelo resistente y T a alelo susceptible.

En SNP B, T corresponde a alelo resistente y C a alelo susceptible.

En SNP C, C corresponde a alelo resistente y T a alelo susceptible.

El al menos un SNP puede identificarse mediante la secuenciación del producto de amplificación por PCR para detectar cualquier cambio de nucleótido. La secuenciación de nucleótidos se puede lograr mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como la reacción de secuenciación de Sanger, seguida de electroforesis capilar.

El al menos un SNP, dentro del al menos un locus marcador que se co-segrega con el locus de resistencia a *Albugo candida*, también puede identificarse mediante el ensayo de discriminación alélica TaqMan. Dicho ensayo TaqMan es una PCR de discriminación alélica que utiliza sondas marcadas con colorante fluorescente para determinar qué alelo está presente (Livak KJ, *Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay*. *Gen Anal-Biomol Eng* 14: 143-149 (1999). Cuando se somete a ensayo el ADN de una planta susceptible, la sonda selectiva para S, marcada con VIC, se reasocia a su secuencia diana y luego se escinde en la PCR por la actividad de 5' nucleasa de la ADN polimerasa Taq, liberando con ello el colorante VIC de su inactivador y dando como resultado un aumento en la fluorescencia de VIC. A la inversa, cuando se somete a ensayo el ADN de una planta resistente, solo la sonda selectiva para R y marcada con FAM se reasocia, resultando la escisión de esta sonda y un aumento en la fluorescencia de FAM. La fluorescencia relativa de estos dos colorantes se mide en tiempo real durante la PCR, con los valores del punto final corregidos para el fondo y representados uno contra otro en un diagrama de dispersión bivariable.

En un aspecto particular, SNP A puede identificarse con un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR representados por un cebador directo de SEQ ID N° 3 y un cebador inverso de SEQ ID N° 4 y una sonda de ADN de SEQ ID N° 5 que define el alelo resistente.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con cualquiera de los aspectos previos, que comprende al menos un alelo o parte del mismo en un locus de rasgo cualitativo en el genoma de *Brassica oleracea* que contribuye en la resistencia a *Albugo candida*, que es complementario al alelo correspondiente presente en *Brassica oleracea* L var *gemmifera* UK 925, cuyas semillas están depositadas con el Número de Depósito NCIMB 41654, o en la progenie o en un antepasado del mismo, y están vinculadas genéticamente a al menos un locus marcador en el genoma de *Brassica oleracea* L var *gemmifera* UK 925, cuyas semillas están depositadas bajo el depósito número NCIMB 41654, o en la progenie o en un antepasado del mismo, cuyo locus marcador se co-segrega con el rasgo de resistencia a *Albugo candida* y comprende un marcador que puede ser identificado en una reacción de PCR mediante la amplificación de un fragmento de ADN con un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR representados por un cebador directo de SEQ ID N° 1 y un cebador inverso de SEQ ID N° 2, o cualquier otro marcador situado en el cromosoma 2 que esté estadísticamente correlacionado y genéticamente relacionado con el rasgo de resistencia a *Albugo candida*.

- 5 En un aspecto de la divulgación, se proporciona una planta de *Brassica oleracea* cultivada resistente a *Albugo candida*, que comprende un determinante genético vinculado al locus de resistencia a *Albugo candida*, en donde el determinante genético se puede obtener de una planta donante que tiene el fondo genético de *Brassica oleracea* L var *gemmifera* UK 925, cuyas semillas están depositadas con el Número de Depósito NCIMB 41654, o en la progenie o en un ancestro del mismo, que comprende dicho determinante genético o una parte que confiere resistencia a *Albugo candida*.
- En un aspecto particular, se proporciona una planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con la presente divulgación, en donde el determinante genético proporciona una resistencia monogénica y dominante, o al menos una resistencia semi-dominante a *Albugo candida*.
- 10 En un aspecto, la presente divulgación concierne a una planta de *Brassica oleracea* cultivada, particularmente un dihaploide, un endógamo o un híbrido.
- En aún otro aspecto preferido, la planta cultivada de acuerdo con la presente divulgación. es estéril masculina, particularmente estéril masculina citoplasmática (CMS).
- 15 La fertilidad masculina de las plantas cultivadas estériles masculinas se puede restablecer mediante métodos bien conocidos en la técnica. La fertilidad masculina de las plantas CMS cultivadas, en particular plantas CMS de *B. oleracea* cultivadas, se restablece preferiblemente mediante fusión celular. Para ello, células de una planta CMS cultivada se fusionan con células de una planta cultivada fértil masculina para reemplazar el núcleo de la planta cultivada fértil por el núcleo de la planta cultivada estéril en el fondo citoplásmico fértil y restablecer la fertilidad. Técnicas de fusión celular son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sigareva y Earle (1997)
- 20 Theor. Appl. Genet. 94: 213-320. Utilizando técnicas de este tipo, plantas cultivadas fértiles masculinas se regeneran, y se les permite auto-polinizarse o cruzarse con otra planta cultivada.
- De acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan semillas de la planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con los diferentes aspectos representados y descritos en esta memoria que comprenden el determinante genético que contribuye a la resistencia a *Albugo candida*.
- 25 En un aspecto particular, la semilla de la planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con los diferentes aspectos representados y descritos en esta memoria es una semilla híbrida.
- Además, la presente invención se refiere a semillas de plantas de *Brassica oleracea* cultivadas de acuerdo con los diferentes aspectos representados y descritos en esta memoria, en donde el locus de resistencia está situado en el cromosoma 2.
- 30 Especies y sub-especies de *Brassica* se describen, por ejemplo, en P. H. Williams (*Screening Crucifers for multiple disease resistance, Workshop 1981, Un. Wisconsin-Madison*) y han sido analizadas además genéticamente en Song, KM et al. (*TAG 75, 1988, 784-794; TAG 76, 1988, 593-600 y TAG 79, 1990, 497-506. Series de 3 artículos*).
- En un aspecto preferido, plantas de *Brassica oleracea* cultivadas de la presente divulgación son, por ejemplo:
- 35 *Brassica oleracea* L. (cultivos de coles) var. *acephala* DC. (coles, repollos) var. *albiflora* Sun [= *B. alboglabra*] (col china) var. *alboglabra* [= *B. alboglabra*] (col china) var. *botrytis* L. (coliflor, brócoli de invierno) var. *capitata* L. (repollo) var. *chinensis* Prain (sarson de Burma) var. *fimbriata* Mill. (col de cocina) var. *fruticosa* Metz. (col de mil cabezas) var. *gemmifera* DC. (coles de Bruselas) var. *gongylodes* L. (colinabo) var. *italica* Plenck. (brócoli, calabrés) var. *sabauda* L. (repollo de savoy) var. *trunchuda* L. H. Bailey (repollo tronchuda) var. *costata* (repollo portugués) var. *medullosa* (col de médula) var. *palmifolia* (col, col de Jersey) var. *ramosa* (col de mil cabezas) var. *sabellica* (col crespita). Plantas de *B. oleracea* cultivadas preferidas de la presente divulgación son repollo blanco, coliflor, coles de Bruselas, repollo Savoy y brócoli.
- 40
- En un aspecto, la presente divulgación también proporciona material vegetal de una planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con cualquier aspecto descrito que comprende hojas, tallos, brotes, raíces, flores, partes de flores, brotes, flósculos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, células o cultivos de tejidos o cualquier otra parte o producto de la planta que aún muestre el fenotipo de resistencia, particularmente cuando se cultiva en una planta-
- 45
- En un aspecto, la planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con la presente divulgación, es una planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, que desarrolla hojas comestibles, flósculos, brotes, cuajos, tallos y brotes para el consumo humano.
- 50 En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para producir o seleccionar una planta de *Brassica oleracea* cultivada que exhibe resistencia a *Albugo candida*, que comprende las etapas de:
- a. seleccionar una planta del género *Brassica* que exhibe resistencia a *Albugo candida*, en donde dicha resistencia está asociada con al menos un determinante genético o una parte funcional del mismo capaz de dirigir o controlar la expresión de dicha resistencia a *Albugo candida*, en donde dicho determinante genético está vinculado genéticamente a al menos un locus marcador, que se co-segrega con el rasgo de resistencia a *Albugo candida* y comprende un marcador que puede identificarse en una reacción PCR mediante la
- 55

amplificación de un fragmento de ADN con un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR representados por un cebador directo de SEQ ID N° 1 y un cebador inverso de SEQ ID N° 2, o cualquier otro marcador situado en el cromosoma 2 que esté correlacionado estadísticamente y vinculado genéticamente al rasgo de resistencia a *Albugo candida*;

- 5 b. cruzar dicha planta de la etapa a), que exhibe resistencia a *Albugo candida*, con una planta de *Brassica*, particularmente una planta de *Brassica oleracea* cultivada, que es susceptible a *Albugo candida* o exhibe un bajo nivel de resistencia contra *Albugo candida*, y
- c. seleccionar la progenie de dicho cruce que exhibe resistencia a *Albugo candida* y demuestra asociación con dicho al menos un locus marcador de la etapa a).

10 En un aspecto particular, en el método para producir o seleccionar una planta de *Brassica oleracea* cultivada resistente a *Albugo candida* tal como se describe arriba, un par de cebadores amplifica un fragmento de ADN que comprende al menos un SNP dentro de al menos un locus marcador que se co-segrega con el locus de resistencia a *Albugo candida*.

15 En un aspecto particular adicional, el al menos un SNP, dentro del al menos un locus marcador que se co-segrega con el locus de resistencia a *Albugo candida*, se selecciona dentro del grupo que comprende:

- i. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos T a C en la posición 134 en el producto amplificado por PCR
- ii. un SNP B representado por un intercambio de nucleótidos C a T en la posición 108 en el producto amplificado por PCR
- 20 iii. un SNP C representado por un intercambio de nucleótidos T a C en la posición 366 en el producto amplificado por PCR

En SNP A, C corresponde a alelo resistente y T a alelo susceptible.

En SNP B, T corresponde a alelo resistente y C a alelo susceptible.

En SNP C, C corresponde a alelo resistente y T a alelo susceptible.

25 En un aspecto del método de selección o producción de una planta de *Brassica oleracea* cultivada resistente a *Albugo candida*, el SNP A puede identificarse con un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR representados por un cebador directo de SEQ ID N° 3 y un cebador inverso de SEQ ID N° 4 y una sonda de ADN de SED ID N° 5 que define el alelo resistente.

30 En un aspecto adicional, se proporciona un método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos previos para obtener una planta de *Brassica oleracea* cultivada, resistente a *Albugo candida*, en donde la planta donante de *Brassica* de la etapa (a) es una planta de *Brassica oleracea* de acuerdo con cualquier aspecto de la presente divulgación, comprendiendo el método la etapa adicional de retrocruzar la planta de *Brassica oleracea* resistente a *Albugo candida* obtenida en la etapa c) con la planta de *Brassica oleracea* susceptible de la etapa b).

35 En un aspecto de la presente divulgación, la determinación de la asociación entre la resistencia a *Albugo candida* y el al menos un locus marcador en la etapa c) del método descrito aquí anteriormente se realiza llevando a cabo una reacción de PCR con los cebadores identificados en la etapa a).

La presente divulgación también proporciona el uso de plantas de *Brassica oleracea* cultivadas resistentes a *Albugo candida* de acuerdo con los diferentes aspectos de la presente divulgación para la producción de una parte de la planta de *Brassica oleracea* para consumo humano.

40 En un aspecto particular, el uso de plantas de *Brassica oleracea* cultivadas resistentes a *Albugo candida* de acuerdo con el aspecto previo comprende una parte de la planta que se selecciona del grupo que comprende: hojas, brotes, flósculos, cuajada, tallo.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para obtener partes comestibles de *Brassica oleracea* resistentes a *Albugo candida*, que comprende las etapas de:

- 45 i. sembrar una semilla de una planta de acuerdo con la presente invención descrita en esta memoria u obtenida en un método como se reivindica en esta memoria, y
- ii. cultivar dicha planta con el fin de producir partes comestibles y cosechar dichas partes comestibles producidas por dicha planta.

50 La presente divulgación describe el uso de material de propagación resistente a *Albugo candida*, obtenible de una planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con la presente divulgación descrita en esta memoria u obtenido

en un método como se reivindica en esta memoria para el cultivo de una planta de *Brassica oleracea* resistente a *Albugo candida* para producir partes comestibles y cosechar dichas partes comestibles.

5 Partes comestibles de una planta de acuerdo con la presente divulgación, comprenden hojas, brotes, tallos de plantas vasculares, tallos, cuajadas, flósculos y similares de una planta de acuerdo con los diferentes aspectos de la presente divulgación.

Partes comestibles de una planta de acuerdo con la presente divulgación, también comprenden partes de una planta procesadas, incluso mínimamente procesadas, tales como hojas trituradas, hojas cortadas, flósculos cortados, brotes cortados, cuajadas cortadas, tallos cortados de plantas vasculares y tallos.

10 De hecho, además del hecho de que *Albugo candida* induce un crecimiento anormal y un rendimiento reducido para la producción de especies de *Brassica* cultivadas, también impacta negativamente sobre el aspecto visual de la parte comestible de la planta. La infección por el patógeno induce esporangios llenos de pústulas blancas o cremosas en las hojas, tallos y partes florales de la planta. Todas estas anomalías constituyen enormes inconvenientes con respecto a la comercialización de la parte comestible de la planta de *Brassica oleracea*, ya que definitivamente no es atractiva con respecto a la consideración del consumidor.

15 Debido a la resistencia de la planta de *Brassica oleracea* cultivada de acuerdo con la presente divulgación a *Albugo candida*, la parte comestible de dicha planta tiene un aspecto mucho más atractivo para el consumidor. Este aspecto atractivo es positivo para el mercado de productos crudos o frescos o para productos intermedios y totalmente procesados. Productos procesados intermedios de este tipo pueden comprender, sin limitación, repollo desmenuzado en bolsas, flósculos de brócoli y cuajadas de coliflor envasadas frescas o congeladas, por ejemplo.

20 La presente divulgación se refiere también al uso de material de propagación resistente a *Albugo candida*, obtenible de una planta de *Brassica oleracea* de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes para el cultivo de una planta resistente a *Albugo candida* con el fin de producir partes comestibles y cosechar dichas partes comestibles.

25 En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para proteger un campo de plantas de *Brassica oleracea*, particularmente plantas de *Brassica oleracea*, contra la infección por *Albugo candida*, en donde dicho método se caracteriza por plantar una semilla de acuerdo con la presente divulgación descrita en esta memoria u obtenida en un método como se reivindica en esta memoria, y haciendo crecer una planta de *Brassica oleracea* cultivada que exhibe una resistencia contra *Albugo candida*. En un aspecto particular adicional, dicha planta o campo de *Brassica* se pulveriza con un agente activo químico de protección de cultivos contra *Albugo candida* en una concentración más baja o menos frecuente que una planta de *Brassica oleracea* que no exhibe dicha resistencia.

30 La presente divulgación es particularmente ventajosa porque la resistencia de la presente invención se transfiere fácilmente entre plantas de *B. oleracea* cultivadas y líneas comerciales. Se obtienen mayores rendimientos debido a la ausencia de enfermedad en plantas cultivadas resistentes. Además, se requieren mucho menos productos químicos de protección de cultivos o ningún producto químico de protección de cultivos contra *Albugo candida* cuando se cultivan plantas de *B. oleracea* cultivadas según la presente divulgación.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para producir semillas híbridas de *Brassica*, particularmente *Brassica oleracea*, resistente a *Albugo candida*, que comprende las etapas de:

- 40
- i. plantar una planta femenina, particularmente una planta femenina estéril masculina, y una planta masculina de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes de acuerdo con la presente divulgación,
 - ii. Efectuar la polinización cruzada entre ambos parentales,
 - iii. cultivar la planta hasta la implantación de la semilla,
 - iv. recoger las semillas y
 - v. obtener las semillas híbridas.

45 En un aspecto particular del método para producir semillas híbridas de acuerdo con el aspecto anterior, el parental femenino estéril masculino es genéticamente estéril masculino (GMS) o citoplásmico estéril masculino (CMS).

En otro aspecto preferido, la planta cultivada de acuerdo con la presente divulgación es homocigota o heterocigota para la resistencia a *Albugo candida*.

Definiciones

50 A las expresiones y términos técnicos usados dentro del alcance de esta solicitud generalmente se les da el significado habitualmente aplicado a los mismos en la técnica relevante de mejoramiento y cultivo de plantas si no se indica lo contrario en esta memoria a continuación.

Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/o", "una" y "el/la" incluyen sus plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una planta" incluye una o más plantas y la referencia a "una célula" incluye mezclas de células, tejidos y similares.

5 Una planta de "*Brassica oleracea*" cultivada se entiende, dentro del alcance de la invención, que se refiere a una planta que ya no está en el estado natural, sino que ha sido desarrollada por el cuidado humano y para uso y/o consumo humano. "Plantas de *Brassica oleracea* cultivadas" se entienden además que excluyen las especies de tipo salvaje que comprenden el rasgo de ser objeto de esta invención como un rasgo natural y/o parte de su genética natural.

10 Un "determinante genético que contribuye a la resistencia" se entiende en esta memoria como un elemento genético hereditario que es capaz de contribuir a la resistencia de la planta contra el patógeno al influir en la expresión de este rasgo de resistencia en el nivel del propio ADN, en el nivel de traducción, transcripción y/o activación de un producto polipeptídico final, es decir, para regular a la baja y contrarrestar la infestación que conduzca a la expresión fenotípica de la resistencia.

15 Se entiende que un "alelo" dentro del alcance de la invención se refiere a formas alternativas o variantes de diversas unidades genéticas idénticas o asociadas con diferentes formas de un gen o de cualquier tipo de elemento genético identificable, que son alternativas en herencia porque están situadas en el mismo locus en cromosomas homólogos. Dichas formas alternativas o variantes pueden ser el resultado de polimorfismos, inserciones, inversiones, translocaciones o deleciones de un solo nucleótido, o la consecuencia de la regulación génica provocada, por ejemplo, por modificación química o estructural, regulación de la transcripción, o modificación/regulación post-traducciona. En una célula u organismo diploide, los dos alelos de un gen o elemento genético dado típicamente ocupan los locus correspondientes en un par de cromosomas homólogos.

20 Un alelo asociado con un rasgo cualitativo puede comprender formas alternativas o variantes de diversas unidades genéticas, incluidas las que son idénticas o están asociadas con un solo gen o múltiples genes o sus productos, o incluso un gen alterado o controlado por un factor genético que contribuye al fenotipo representado por el locus.

25 Como se usa en esta memoria, la expresión "alelo marcador" se refiere a una forma alternativa o variante de una unidad genética como se define en este documento anteriormente, cuando se usa como un marcador para ubicar locus genéticos que contienen alelos en un cromosoma que contribuyen a la variabilidad de los rasgos genotípicos.

30 Como se usa en esta memoria, el término "reproducción", y variantes gramaticales del mismo, se refieren a cualquier proceso que genere un individuo de la descendencia. Las reproducciones pueden ser sexuales o asexuales, o cualquier combinación de las mismas. Tipos no limitantes a modo de ejemplo de reproducciones incluyen cruces, autopolinización, generación de derivados haploides duplicados y combinaciones de los mismos.

35 Como se usa en esta memoria, la frase "población reproductora establecida" se refiere a una colección de potenciales participantes en la reproducción producidos por y/o utilizados como parentales en un programa de reproducción; *p. ej.*, un programa de reproducción comercial. Los miembros de la población reproductora establecida están típicamente bien caracterizados genética y/o fenotípicamente. Por ejemplo, varios rasgos fenotípicos de interés podrían haber sido evaluados, *p. ej.*, bajo diferentes condiciones ambientales, en múltiples ubicaciones y/o en diferentes momentos. Alternativamente o además, uno o más loci genéticos asociados con la expresión de los rasgos fenotípicos podrían haber sido identificados y uno o más de los miembros de la población reproductora podrían haber sido genotipados con respecto al uno o más loci genéticos, así como con respecto a uno o más marcadores genéticos que están asociados con uno o más loci genéticos.

40 Como se usa en esta memoria, la frase "individuo diploide" se refiere a un individuo que tiene dos conjuntos de cromosomas, típicamente uno de cada uno de sus dos parentales. Sin embargo, se entiende que, en algunas realizaciones, un individuo diploide puede recibir sus conjuntos de cromosomas "maternos" y "paternos" del mismo organismo individual, tal como cuando una planta se autofecunda para producir una generación posterior de plantas.

45 Se entiende dentro del alcance de la invención que "homocigótico" se refiere a alelos similares en uno o más loci correspondientes en cromosomas homólogos.

50 Se entiende dentro del alcance de la invención que "heterocigótico" se refiere a alelos diferentes en uno o más loci correspondientes en cromosomas homólogos.

Se entiende por "retrocruzamiento" dentro del alcance de la invención para referirse a un proceso en el que una progenie híbrida se retrocruza repetidamente con uno de los parentales. Se pueden utilizar diferentes parentales recurrentes en retrocruzamientos posteriores.

55 Se entiende dentro del alcance de la invención que "locus" se refiere a una región en un cromosoma, que comprende un gen o cualquier otro elemento genético o factor que contribuye a un rasgo.

Como se usa en esta memoria, "locus marcador" se refiere a una región de un cromosoma, que comprende un nucleótido o una secuencia de polinucleótidos que está presente en el genoma de un individuo y que se asocia con uno o más loci de interés, que puede que comprendan un gen o cualquier otro elemento o factor genético que contribuya a un rasgo. "Locus marcador" también se refiere a una región en un cromosoma, que comprende una

5 secuencia de polinucleótidos complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico utilizado como sondas.

"Ligamiento genético" se entiende dentro del alcance de la invención que se refiere a una asociación de caracteres de herencia debido a la ubicación de genes en la proximidad en el mismo cromosoma, medidos por porcentaje de recombinación entre loci (centi-Morgan, cM).

10 Para los fines de la presente invención, el término "co-segregación" se refiere al hecho de que el alelo para el rasgo y el o los alelos para el o los marcadores tienden a transmitirse juntos, porque están físicamente juntos en el mismo cromosoma (recombinación reducida entre ellos debido a su proximidad física) que resulta en una asociación no aleatoria de sus alelos como resultado de su proximidad en el mismo cromosoma. La "co-segregación" también se refiere a la presencia de dos o más rasgos dentro de una única planta de los que se sabe que al menos uno es

15 genético y que no puede explicarse fácilmente por casualidad.

Como se usa en esta memoria, la expresión "arquitectura genética en el locus del rasgo cualitativo" se refiere a una región genómica que está correlacionada estadísticamente con el rasgo fenotípico de interés y representa la base genética subyacente del rasgo fenotípico de interés.

20 Como se usa en esta memoria, las frases "cruzada sexualmente" y "reproducción sexual" en el contexto de la materia objeto actualmente descrita se refieren a la fusión de gametos para producir progenie (*p. ej.*, mediante fertilización, tal como para producir semillas por polinización en plantas). Un "cruce sexual" o una "fertilización cruzada" es en algunas realizaciones la fertilización de un individuo por otro (*p. ej.*, polinización cruzada en plantas). El término "autofecundación" se refiere en algunas realizaciones a la producción de semilla mediante auto-fertilización o auto-polinización; *es decir*, el polen y el óvulo son de la misma planta.

25 Como se usa en esta memoria, la frase "marcador genético" se refiere a una característica del genoma de un individuo (*p. ej.*, un nucleótido o una secuencia de polinucleótidos que está presente en el genoma de un individuo que está asociado con uno o más loci de interés. En algunas realizaciones, un marcador genético es polimórfico en una población de interés, o el locus ocupado por el polimorfismo, dependiendo del contexto. Marcadores genéticos incluyen, por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), indels (*es decir*, inserciones/deleciones),

30 repeticiones de secuencia simple (SSR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórficos amplificados aleatorios (RAPD), marcadores de secuencia polimórfica amplificada escindida (CAPS), marcadores de Tecnología de Matrices de Diversidad (DART) y polimorfismos de longitud de fragmento amplificada (AFLP), entre muchos otros ejemplos. Los marcadores genéticos pueden usarse, por ejemplo, para localizar loci genéticos que contienen alelos en un cromosoma que contribuye a variabilidad de rasgos fenotípicos. La expresión

35 "marcador genético" también puede referirse a una secuencia polinucleotídica complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico usado como sonda.

Un marcador genético puede estar físicamente situado en una posición en un cromosoma que se encuentra dentro o fuera del locus genético con el que está asociado (*es decir*, es intragénico o extragénico, respectivamente). Dicho de otra manera, mientras que los marcadores genéticos se emplean típicamente cuando la ubicación en un

40 cromosoma del gen o de una mutación funcional, *p. ej.*, dentro de un elemento de control fuera de un gen, que corresponde al locus de interés no se ha identificado y existe una tasa de recombinación no nula entre el marcador genético y el locus de interés, la materia objeto actualmente descrita también puede emplear marcadores genéticos que están físicamente dentro de los límites de un locus genético (*p. ej.*, dentro de una secuencia genómica que corresponde a un gen, tal como, pero no limitado a un polimorfismo dentro de un intrón o un exón de un gen). En

45 algunas realizaciones la materia objeto descrita en la presente, el uno o más marcadores genéticos comprenden entre uno y diez marcadores, y en algunas realizaciones el uno o más marcadores genéticos comprenden más de diez marcadores genéticos.

Como se usa en esta memoria, el término "genotipo" se refiere a la constitución genética de una célula u organismo. El "genotipo para un conjunto de marcadores genéticos" de un individuo incluye los alelos específicos

50 para uno o más loci marcadores genéticos, presentes en el haplotipo de un individuo. Como se sabe en la técnica, un genotipo puede estar relacionado con un único locus o con múltiples loci, pudiendo estar los loci relacionados o no relacionados y/o ligados o no ligados. En algunas realizaciones, el genotipo de un individuo se refiere a uno o más genes que están relacionados en el sentido de que uno o más de los genes están implicados en la expresión de un fenotipo de interés. Por tanto, en algunas realizaciones, un genotipo comprende un sumario de uno o más

55 alelos presentes dentro de un individuo en uno o más locus genéticos de un rasgo cuantitativo. En algunas realizaciones, un genotipo se expresa en función de un haplotipo (definido en este documento más adelante).

Como se usa en esta memoria, el término "germoplasma" se refiere a la totalidad de los genotipos de una población u otro grupo de individuos (*p. ej.*, una especie). El término "germoplasma" también puede referirse a material vegetal; *p. ej.*, un grupo de plantas que actúan como un repositorio para varios alelos. La frase "germoplasma

- adaptado" se refiere a materiales vegetales de superioridad genética probada; *p. ej.*, para un entorno o área geográfica dado, mientras que las frases "germoplasma no adaptado", "germoplasma bruto" y "germoplasma exótico" se refieren a materiales vegetales de valor genético desconocido o no probado; *p. ej.*, para un entorno o área geográfica dada; como tal, la frase "germoplasma no adaptado" se refiere en algunas realizaciones a
- 5 materiales vegetales que no forman parte de una población reproductora establecida y que no tienen una relación conocida con un miembro de la población reproductora establecida.
- Como se usa en esta memoria, los términos "híbrido" y "planta híbrida" y "progenie híbrida" se refieren a un individuo producido a partir de parentales genéticamente diferentes (*p. ej.*, un individuo genéticamente heterocigoto o en su mayoría heterocigoto).
- 10 Como se usa en esta memoria, la frase "híbrido F₁ de cruce único" se refiere a un híbrido F₁ producido a partir de un cruce entre dos líneas endogámicas.
- Como se usa en esta memoria, la expresión "línea endogámica" se refiere a una población genéticamente homocigótica o casi homocigótica. Una línea endogámica, por ejemplo, puede obtenerse mediante varios ciclos de reproducción entre hermanos o de autopolinización o en producción de dihaploides. En algunas realizaciones, las
- 15 líneas endogámicas reproducen verdaderamente uno o más rasgos fenotípicos de interés. Un «endógamo», «individuo endógamo» o "progenie endógama" es un individuo muestreado de una línea endogámica.
- Como se usa en esta memoria, la expresión "línea dihaploide" se refiere a líneas endogámicas estables emitidas desde otro cultivo. Algunos granos de polen (haploides) cultivados en medio y circunstancias específicas pueden desarrollar plántulas que contienen n cromosomas. Estas plántulas entonces están "duplicadas" y contienen 2n cromosomas. La progenie de estas plántulas se denomina "dihaploide" y esencialmente ya no se segrega (es estable).
- 20 Como se usa en esta memoria, el término "ligamiento" y variantes gramaticales del mismo, se refiere a la tendencia de alelos en diferentes loci en el mismo cromosoma de segregarse juntos más a menudo que lo que se esperaría por probabilidad si su transmisión fuera independiente, en algunas realizaciones como una consecuencia de su proximidad física.
- 25 Como se usa en esta memoria, la frase "ácido nucleico" se refiere a cualquier cadena física de unidades monoméricas que pueden corresponder a una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (*p. ej.*, un ADN típico, ADNc o polímero de ARN), oligonucleótidos modificados (*p. ej.*, oligonucleótidos que comprenden bases que no son típicas del ARN o ADN biológico, tales como oligonucleótidos 2'-O-metilados), y similares. En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede ser de cadena sencilla, de doble cadena, de múltiples cadenas o combinaciones de los mismos. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico de la materia objeto descrita comprende o codifica opcionalmente secuencias complementarias, además de cualquier secuencia explícitamente indicada.
- 30 Como se usa en esta memoria, la frase "rasgo fenotípico" se refiere a la apariencia u otra característica detectable de un individuo, que resulta de la interacción de su genoma, proteoma y/o metaboloma con el entorno.
- 35 Como se usa en esta memoria, la frase "resistencia" se refiere a la capacidad de una planta de restringir el crecimiento y desarrollo de un patógeno específico y/o el daño que provocan cuando se comparan con plantas susceptibles en condiciones ambientales similares y la presión del patógeno. Las plantas resistentes pueden presentar algunos síntomas de la enfermedad o daños bajo la presión del patógeno, *p. ej.*, hongos.
- 40 De acuerdo con la Asociación Europea de Semillas y tal como se utiliza en la misma, el término "resistencia" incluye "resistencia estándar" y "resistencia intermedia".
- "Resistencia estándar" se refiere a las plantas que restringen en gran medida el crecimiento y desarrollo de la plaga o el patógeno especificado bajo la presión normal de plagas o patógenos y/o son lo suficientemente poco atractivas para la plaga o el patógeno especificado para que no presente o solo presente síntomas o daños menores de la enfermedad. cuando se compara con equivalentes susceptibles. Estas plantas pueden, sin embargo, exhibir algunos
- 45 síntomas de enfermedad o daño bajo una fuerte presión de plagas o patógenos.
- "Resistencia intermedia" se refiere a plantas que distraen a los insectos y/o restringen el crecimiento y desarrollo de la plaga o patógeno especificado, o muestran un daño reducido en comparación con sus equivalentes susceptibles, pero pueden exhibir una mayor variedad de síntomas o daños en comparación con plantas resistentes estándar.
- 50 Plantas con resistencia intermedia seguirán mostrando síntomas o daños mucho menos graves que las plantas susceptibles cuando se cultivan en condiciones ambientales similares y/o la presión de plagas o patógenos.
- Como se usa en esta memoria, el término "susceptibilidad" se refiere a la incapacidad de una planta para restringir adecuadamente el crecimiento y desarrollo de un patógeno específico.
- 55 Como se usa en esta memoria, la frase "resistencia a *Albugo*" o "resistencia a *Albugo candida*" o "planta resistente a *Albugo*" se refiere a la capacidad de las plantas de resistir la colonización por el hongo.

La resistencia a *Albugo* se determina dentro del alcance de la presente invención en un ensayo patológico tal como se describe en detalle en el Ejemplo 1. En particular, una planta resistente a *Albugo candida* en el contexto de la presente invención muestra una puntuación comprendida entre 6 y 9 en la escala de acuerdo con el ensayo patológico del Ejemplo 1.

5 Como se usa en esta memoria, el término "pluralidad" se refiere a más de uno. Por lo tanto, una " pluralidad de individuos " se refiere a al menos dos individuos. En algunas realizaciones, el término pluralidad se refiere a más de la mitad del total. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una "pluralidad de una población" se refiere a más de la mitad de los miembros de esa población.

10 Como se usa en esta memoria, el término "progenie" se refiere al o a los descendientes de un cruce particular. Típicamente, la progenie resulta de la reproducción de dos individuos, aunque algunas especies (particularmente algunas plantas y animales hermafroditas) pueden autofecundarse (*es decir*, la misma planta actúa como donante de gametos tanto masculinos como femeninos). El o los descendientes pueden ser, por ejemplo, de la F₁, la F₂, o cualquier generación posterior.

15 Como se usa en esta memoria, la frase "rasgo cualitativo" se refiere a un rasgo fenotípico que es controlado por uno o unos pocos genes que exhiben efectos fenotípicos importantes. Debido a esto, los rasgos cualitativos son típicamente heredados simplemente. Ejemplos en plantas incluyen, pero no se limitan a, color de la flor, color del fruto y varias resistencias a enfermedades conocidas, tales como, por ejemplo, resistencia a la mancha de hongos.

20 La "selección basada en marcadores" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse, p. ej., al uso de marcadores genéticos para detectar uno o más ácidos nucleicos de la planta, en que el ácido nucleico está asociado con un rasgo deseado para identificar plantas que portan genes para rasgos deseables (o indeseables), de modo que esas plantas puedan usarse (o evitarse) en un programa de reproducción selectiva.

25 "Marcador microsatélite o SSR (Repeticiones de Secuencia Simple)se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a un tipo de marcador genético que consiste en numerosas repeticiones de secuencias cortas de bases de ADN, que se encuentran en los loci por todo el genoma de la planta y tienen una probabilidad de ser altamente polimórficos.

" PCR (reacción en cadena de la polimerasa)" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a un método para producir cantidades relativamente grandes de regiones específicas de ADN o subconjunto(s) del genoma, haciendo posible con ello diversos análisis que se basan en estas regiones.

30 "Cebador de PCR" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a fragmentos relativamente cortos de ADN de cadena sencilla utilizado en la amplificación por PCR de regiones específicas de ADN.

Se entiende que " fenotipo" dentro del alcance de la invención se refiere a una o más característica(s) distinguibles de un rasgo genéticamente controlado.

35 Como se usa en esta memoria, "rasgo" se refiere a una característica o fenotipo, por ejemplo una resistencia a una enfermedad. Un rasgo puede heredarse de una manera dominante o recesiva, o puede ser monogénico o poligénico. Un rasgo es, por ejemplo, una resistencia a una enfermedad.

Como se usa en esta memoria, la frase "rasgo fenotípico" se refiere a la apariencia u otra característica detectable de un individuo, que resulta de la interacción de su genoma, proteoma y/o metaboloma con el entorno.

40 Se entiende que "polimorfismo" dentro del alcance de la invención se refiere a la presencia en una población de dos o más formas diferentes de un gen, marcador genético o rasgo heredado o un producto génico obtenible, por ejemplo, mediante corte y empalme alternativo, metilación del ADN, etc.

"Reproducción selectiva" se entiende dentro del alcance de la invención que se refiere a un programa de reproducción que utiliza plantas que poseen o muestran rasgos deseables como parentales.

45 Dentro del alcance de la invención, se entiende que la planta " de prueba" se refiere a una planta del género *Brassica* utilizada para caracterizar genéticamente un rasgo en una planta a ensayar. Típicamente, la planta que se va a ensayar se cruza con una planta "de prueba" y se puntúa la relación de segregación del rasgo en la progenie del cruce.

50 "Sonda", como se usa en esta memoria,se refiere a un grupo de átomos o moléculas que es capaz de reconocer y de unirse a una molécula diana específica o estructura celular y, por lo tanto, permite la detección de la molécula o estructura diana. Particularmente,, "sonda" se refiere a una secuencia de ADN o ARN marcada que se puede usar para detectar la presencia de y cuantificar una secuencia complementaria mediante hibridación molecular.

El término "hibridar", como se usa en esta memoria, se refiere a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente a condiciones de hibridación en las que se usa 5xSSPE, SDS al 1%, solución Denhardt 1x como una solución y/o las temperaturas de hibridación están entre 35°C y 70°C, preferiblemente en 65°C. Después de la hibridación, el lavado se realiza preferiblemente primero con 2xSSC, SDS al 1% y luego con 0.2xSSC a

temperaturas entre 35°C y 75°C, particularmente entre 45°C y 65°C, pero especialmente a 59°C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardt, véase Sambrook et al., loc. cit.). Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad, como se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., supra, son particularmente preferidas. Condiciones de hibridación rigurosas particularmente preferidas están presentes, por ejemplo, si la hibridación y el lavado se producen a 65°C, como se indicó anteriormente. Condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo, con la hibridación y el lavado llevados a cabo a 45°C, son menos preferidas y a 35°C incluso menos.

"Homología de Secuencia o Identidad de Secuencia" se usa en esta memoria indistintamente. Los términos "idénticas" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o proteínas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia, según se miden utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Si las dos secuencias que deben compararse entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia se relaciona preferiblemente con el porcentaje de los residuos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de nucleótidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia se puede determinar convencionalmente con el uso de programas de computadora como el programa Bestfit (Paquete de Análisis de Secuencia de Wisconsin, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, con el fin de encontrar el segmento con la mayor identidad de secuencia entre dos secuencias. Cuando se utiliza Bestfit u otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene, por ejemplo, una identidad del 95% con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferiblemente de modo que el porcentaje de identidad se calcule en toda la longitud de la secuencia de referencia, y que se permiten brechas de homología de hasta el 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los denominados parámetros opcionales se dejan preferiblemente en sus valores predeterminados ("por defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias de la invención arriba descritas pueden ser provocadas, por ejemplo, por adición, delección, sustitución, inserción o recombinación. Esta comparación de secuencias también se puede realizar preferiblemente con el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, septiembre de 1998 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ejemplos adjuntos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Para este fin, pueden usarse los ajustes de parámetros "por defecto".

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas. La frase: "hibridación específicamente a" se refiere a la unión, duplicación o hibridación de una molécula solo a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (p. ej., celular total) ADN o ARN. "Se une(n) sustancialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico sonda y un ácido nucleico diana y abarca desajustes menores que pueden acomodarse reduciendo la rigurosidad de los medios de hibridación para lograr la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

Las "condiciones de hibridación rigurosas" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas", en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tales como las hibridaciones de Southern y Northern, dependen de la secuencia y son diferentes para parámetros ambientales distintos. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* parte I capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, Nueva York. En general, las condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C. más bajas que el punto de fusión térmico para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Normalmente, en "condiciones rigurosas" hibridará una sonda con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias.

El punto de fusión térmico es la temperatura (con una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Se seleccionan condiciones muy estrictas para que sean iguales a la $T_{sub m}$ para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios en un filtro en una transferencia Southern o northern son formamida al 50% con 1 mg de heparina a 42°C, y la hibridación se lleva a cabo durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es NaCl 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos.. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado SSC 0,2 veces a 65°C. durante 15 minutos (véase Sambrook, infra, para una descripción de tampón SSC). A menudo, un lavado de rigurosidad alta va precedido por un lavado de rigurosidad baja para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un ejemplo de lavado de rigurosidad media para un dúplex de, p. ej., más de 100 nucleótidos, es 1 vez SSC a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de rigurosidad baja para un dúplex de, p. ej., más de 100 nucleótidos, es 4-6 veces SSC a 40°C durante 15 minutos. Para sondas cortas (p. ej., aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas implican típicamente concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1,0 M ion Na, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ion Na (u otras sales) a pH 7.0 a 8.3, y la temperatura es típicamente de al menos aproximadamente 30°C. También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes como formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2 veces (o mayor) que

- la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto ocurre, p. ej., cuando se crea una copia de un ácido nucleico utilizando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético.
- Una "planta" es cualquier planta en cualquier fase de desarrollo, particularmente una planta de semilla.
- Una "célula vegetal" es una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una única célula aislada o de una célula cultivada, o formar parte de una unidad con una organización superior tal como, por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta entera.
- "Cultivo de células vegetales" significa cultivos de unidades de plantas tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivos celulares, células en tejidos vegetales, polen, tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diversas fases de desarrollo.
- "Material vegetal" o "material vegetal que se obtiene de una planta" se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, cultivos celulares o de tejidos, o cualquier otra parte o producto de una planta.
- Un "órgano de una planta" es una parte distinta y visiblemente estructurada y diferenciada de una planta, tal como una raíz, un tallo, una hoja, una yema floral o un embrión.
- "Tejido vegetal", como se usa en esta memoria, se refiere a un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional. Se incluye cualquier tejido de una planta en la planta o en cultivo. Esta expresión incluye, aunque sin limitación, plantas enteras, órganos vegetales, semillas de plantas, cultivo tisular y cualquier grupo de células vegetales organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. El uso de esta expresión junto con, o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido vegetal, como los enumerados anteriormente o que esté contemplado de otra manera por esta definición, no pretende ser exclusivo de ningún otro tipo de tejido vegetal.
- Los términos "raza" o "razas" se refieren a cualquier grupo de endogamia, incluidos los subgrupos taxonómicos, tales como subespecies, subordinados taxonómicamente a una especie y subordinados a una subespecie y marcados por un perfil predeterminado de factores latentes de rasgos hereditarios.
- Como se usa en esta memoria, el término "población" significa una colección genéticamente heterogénea de plantas que comparten una derivación genética común.
- Como se usa en esta memoria, el término "variedad" o "cultivar" significa un grupo de plantas similares que, por sus características estructurales y su rendimiento, pueden identificarse a partir de otras variedades dentro de la misma especie.
- Como se usa en esta memoria, "semi-dominancia" significa dominancia incompleta; la producción de un fenotipo intermedio en individuos heterocigotos para el gen en cuestión; generalmente se considera un tipo de dominancia incompleta, con un heterocigoto que se parece más a un homocigoto que a otro.
- Como se usa en esta memoria, "dominante" significa: un gen que produce el mismo carácter fenotípico cuando sus alelos están presentes en una dosis única (heterocigótica) por núcleo, como ocurre en una dosis doble (homocigótica).
- Como se usa en esta memoria, "recesivo" significa para un gen y/o alelo cuyo efecto fenotípico se expresa en el estado homocigoto, pero se enmascara en presencia del alelo dominante en el estado heterocigoto.
- En una realización, la presente invención se refiere a nuevas plantas de *Brassica* resistentes a *Albugo candida*, particularmente plantas y líneas de *Brassica oleracea*, y a métodos mejorados para producirlas utilizando los marcadores moleculares descritos en esta memoria en técnicas de reproducción selectiva. Plantas de *Brassica* que no contienen al menos uno del locus marcador identificados en esta memoria son susceptible a la infección por *Albugo candida*.
- En particular, el al menos un locus marcador que controla la resistencia a *Albugo candida* está situado dentro del genoma de la planta de *Brassica oleracea* resistente a *Albugo candida*. Marcadores moleculares co-segregantes con la resistencia a *Albugo candida* se pueden identificar utilizando la selección asistida por marcadores, cuyas técnicas son bien conocidas en la técnica. Marcadores que se pueden utilizar en técnicas de selección de este tipo están representados por al menos un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo de cebadores dados en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, por cualquier marcador adyacente que esté correlacionado estadísticamente y por lo tanto co-segrega con el rasgo de resistencia a *Albugo candida*.

En un aspecto, la planta de acuerdo con la presente invención puede obtenerse mediante la introgresión del rasgo de resistencia a *Albugo candida* de una planta ancestral, particularmente una planta ancestral silvestre en una planta de *Brassica* cultivada, particularmente una planta de *Brassica oleraceae* cultivada.

5 En una realización específica de la invención, el ancestro salvaje a partir del cual se puede obtener el rasgo de resistencia a *Albugo candida* es una *Brassica oleracea* de tipo salvaje, particularmente *Brassica oleracea acephala* HRI 1205 primitiva silvestre, o de una progenie o un ancestro de la misma que comprende dicho locus de rasgo de resistencia.

Para este acceso se puede proporcionar el siguiente historial de fuentes:

- o El acceso se recogió en Portugal el 4-oct-1993.
- 10 o Localidad Quinta da Igreja. Macainhas de baixo guarda
- o Donantes UNKFARIAS ASTLEY & CHEUNG SO MUI.
- o Mantenido por Warwick HRI Genetic Resources Unit Universidad de Warwick, Wellesbourne, Warwick, Reino Unido.

15 El rasgo de resistencia de acuerdo con la presente invención, que confiere a una planta que expresa este rasgo resistencia a las infestaciones con *Albugo candida*, puede obtenerse, como alternativa, de *Brassica oleracea* L var *gemmifera* UK 925, cuyas semillas están depositadas bajo el Número de depósito NCIMB 41654.

20 *Brassica oleracea* L var *gemmifera* UK 925 resultó de un cruce de *Brassica oleracea* acephala HRI 1205, como el donante del rasgo de resistencia con una línea endógama de col de Bruselas. Progenie resistente de *Albugo* de este cruce se retrocruzó con la línea de col de Bruselas receptora y, a continuación, se autofecundó varias veces con el fin de tener una línea fija para la resistencia. La línea fija de resistencia se cruzó luego con una línea femenina que contenía CMS con el fin de obtener la UK 925 *Brassica oleracea* L var *gemmifera*, cuya semilla está depositada bajo el Número de depósito NCIMB 41654.

25 Además, otros accesos de especies relacionadas de *Brassica oleracea* pueden examinarse en cuanto a la presencia de al menos uno de los loci marcadores identificados en esta memoria utilizando los marcadores de la presente invención.

Los marcadores moleculares proporcionados en esta memoria y que se co-segregan con al menos un locus marcador que contribuye a la resistencia a *Albugo candida*, pueden utilizarse para introgresar uno o más de dichos loci marcadores de una primera planta donante en una segunda planta receptora.

Basado en la descripción de la presente invención, la persona experta que está en posesión de

30 *Brassica oleracea* L var *gemmifera* UK 925 o de un ancestro que contiene un locus rasgo asociado con resistencia a *Albugo candida*, no tiene dificultad alguna para transferir el rasgo de resistencia a *Albugo candida* de la presente invención a otras plantas de *Brassica oleracea* cultivadas de diversos tipos y cultivares utilizando técnicas de reproducción bien conocidas en la técnica.

35 Por lo tanto, el rasgo de la presente invención se puede transferir a una planta de *Brassica oleracea* cultivada tal como *Brassica oleracea* L. (cultivos de coles) var. *acephala* DC. (coles, repollos) var. *albiflora* Sun [= *B. alboglabra*] (col china) var. *alboglabra* [= *B. alboglabra*] (col china) var. *botrytis* L. (coliflor, brócoli de invierno) var. *capitata* L. (repollo) var. *chinensis* Prain (sarson de Burma) var. *fimbriata* Mill. (col de cocina) var. *fruticosa* Metz. (col de mil cabezas) var. *gemmifera* DC. (coles de Bruselas) var. *gongyloides* L. (colinabo) var. *italica* Plenck. (brócoli, calabrés) var. *sabauda* L. (repollo de savoy) var. *tranchuda* L. H. Bailey (repollo tronchuda) var. *costata* (repollo portugués) var. *medullosa* (col de médula) var. *palmifolia* (col, col de Jersey) var. *ramosa* (col de mil cabezas) var. *sabellica* (col crespá).

45 La planta receptora es preferiblemente una planta de *Brassica* cultivada, particularmente una *Brassica oleraceae* cultivada, más particularmente una *Brassica oleracea* cultivada seleccionada del grupo que comprende: *Brassica oleracea* L. (cultivos de coles) var. *acephala* DC. (coles, repollos) var. *albiflora* Sun [= *B. alboglabra*] (col china) var. *alboglabra* [= *B. alboglabra*] (col china) var. *botrytis* L. (coliflor, brócoli de invierno) var. *capitata* L. (repollo) var. *chinensis* Prain (sarson de Burma) var. *fimbriata* Mill. (col de cocina) var. *fruticosa* Metz. (col de mil cabezas) var. *gemmifera* DC. (coles de Bruselas) var. *gongyloides* L. (colinabo) var. *italica* Plenck. (brócoli, calabrés) var. *sabauda* L. (repollo de savoy) var. *tranchuda* L. H. Bailey (repollo tronchuda) var. *costata* (repollo portugués) var. *medullosa* (col de médula) var. *palmifolia* (col, col de Jersey) var. *ramosa* (col de mil cabezas) var. *sabellica* (col crespá). Plantas de *Brassica oleraceae* cultivadas preferidas de la presente divulgación son repollo blanco, coliflor, coles de Bruselas, repollo Savoy y brócoli.

50 Plantas de *Brassica* cultivadas, desarrolladas de acuerdo con la presente divulgación, pueden derivar ventajosamente la mayoría de sus rasgos de la planta receptora, y derivar la resistencia a *Albugo candida* de la

primera planta donante. De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, los genes que codifican la resistencia a *Albugo candida* se mapean mediante la identificación de marcadores moleculares vinculados a loci de rasgos cualitativos de resistencia, utilizando el mapeo una mezcla de plantas de *Brassica* endógamas resistentes y susceptibles a *Albugo candida* para la puntuación fenotípica. La caracterización molecular de líneas de este tipo se puede realizar utilizando las técnicas descritas por Monforte y Tanksley in Genome, 43: 803-813 (2000).

En otro aspecto de la presente divulgación, la presente divulgación se refiere a métodos para producir nuevas plantas superiores de *Brassica* resistentes a *Albugo candida*. En el método de la presente divulgación, uno o más genes que codifican la resistencia a *Albugo candida* se integran de una planta parental donante que es resistente a *Albugo candida* en una planta de *Brassica* cultivada receptora que no es resistente o una planta que tiene un nivel bajo de resistencia a la infección por *Albugo candida*. Las plantas de *Brassica oleracea* cultivadas, resistentes a *Albugo candida* de acuerdo con los presentes aspectos de la divulgación o producidas de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden ser plantas de *Brassica* endógamas, híbridas o dihaploides.

La integración de uno o más genes que codifican la resistencia a *Albugo candida* en una planta de *Brassica* receptora que no es resistente o posee un bajo nivel de resistencia a *Albugo candida* se puede lograr utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, uno o más genes que codifican la resistencia a *Albugo candida* pueden integrarse en una planta de *Brassica oleracea* receptora que no es resistente o una planta que tiene un bajo nivel de resistencia a *Albugo candida* utilizando técnicas de reproducción tradicionales.

La resistencia a *Albugo candida* fue transferido a diferentes especies de *Brassica oleracea* cultivadas, en particular, el repollo blanco, la coliflor, el brócoli y las coles de Bruselas, utilizando técnicas de reproducción convencionales bien conocidos en la técnica de *Brassica*. El rasgo también se integró en líneas de élite de *Brassica oleracea* cultivadas. La integración de la resistencia en la línea de élite se puede lograr, por ejemplo, mediante reproducción por selección recurrente, por ejemplo, mediante retrocruzamiento.

En este caso, la línea de élite (parental recurrente) se cruza primero con un endógamo donante (el parental no recurrente) que porta la resistencia. La progenie de este cruce se retrocruza luego al parental recurrente, seguido de la selección en la progenie resultante de resistencia a *Albugo candida*. Después de dos, preferiblemente tres, preferiblemente cuatro, más preferiblemente cinco o más generaciones de retrocruzamientos con el parental recurrente con selección para resistencia a *Albugo candida*, la progenie es heterocigótica para el locus que alberga la resistencia, pero es como el parental recurrente para la mayoría o casi todos los otros genes (véase, por ejemplo, Poehlman y Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4ª Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360-376, incorporado aquí como referencia). La selección de la resistencia a *Albugo candida* se realiza después de cada uno de los cruces.

Las plantas de *Brassica oleracea* cultivadas de acuerdo con la presente invención y como se describen en esta memoria pueden utilizarse en la producción comercial de semillas de *Brassica oleracea*. Las plantas comerciales de *Brassica oleracea* son generalmente híbridos producidos a partir del cruce de dos líneas parentales (endógamas). El desarrollo de híbridos requiere, en general, el desarrollo de líneas endógamas homocigóticas, el cruce de estas líneas y la evaluación de las cruces.

Se utilizan métodos de reproducción de pedigrí y de reproducción de selección recurrente para desarrollar líneas endógamas a partir de poblaciones reproductoras. Los programas de reproducción combinan los antecedentes genéticos de dos o más líneas endógamas o diversas otras fuentes de germoplasma en grupos de reproducción a partir de los cuales se desarrollan nuevas líneas endógamas mediante autofecundación y selección de los fenotipos y características deseados. Las nuevas líneas endógamas se cruzan con otras líneas endogámicas y los híbridos de estos cruces se evalúan para determinar los que tengan un potencial comercial. La reproducción vegetal y el desarrollo híbrido son procesos costosos y de mano de obra y tiempo.

La reproducción de pedigrí comienza con el cruce de dos genotipos, cada uno de los cuales puede tener una o más características comercialmente deseables, tales como, pero no limitadas a resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas del fruto, mayor rendimiento, etc. que carece en el otro o que complementa al otro. Si los dos parentales originales no proporcionan todas las características deseadas, se pueden incluir otras fuentes en la población reproductora para generar una población reproductora establecida. En el método de pedigrí, plantas superiores se auto-fecundan y se seleccionan en generaciones sucesivas. En las generaciones sucesivas la condición heterocigota da paso a líneas homogéneas como resultado de la auto-polinización y selección. Típicamente en el método de reproducción de pedigrí se ponen en práctica cinco o más generaciones de autofecundación y selección: F1 a F2; F3 a F4; F4 a F5, etc. Un híbrido de un único cruce resulta del cruce de dos líneas endógamas, cada una de las cuales tiene un genotipo que complementa el genotipo de la otra. La progenie híbrida de la primera generación se designa F1. En el desarrollo de híbridos comerciales solo se buscan las plantas híbridas F1. Híbridos F1 preferidos son más vigorosos que sus parentales endógamos. Este rendimiento híbrido (vigor híbrido o heterosis), se puede manifestar en muchos rasgos poligénicos, incluido el aumento del crecimiento vegetativo y el aumento del rendimiento. Las plantas de *Brassica* pueden ser fácilmente polinizadas de forma cruzada. Un rasgo también se transfiere fácilmente de una planta de *Brassica* a otra planta, incluyendo plantas de *Brassica* de diferentes tipos que utilizan técnicas de reproducción convencionales, por ejemplo para obtener más líneas comerciales. La integración de un rasgo en la línea de élite se logra, por ejemplo, mediante reproducción por

selección recurrente, por ejemplo, mediante retrocruzamiento. En este caso, la línea de élite (parental recurrente) se cruza primero con un endógamo donante (el parental no recurrente) que porta el rasgo, particularmente el rasgo de "resistencia a *Albugo candida*" de acuerdo con la presente invención. La progenie de este cruce se retrocruza luego al parental recurrente, seguido de la selección en la progenie resultante para el rasgo. Después de tres, 5 preferiblemente cuatro, más preferiblemente cinco o más generaciones de retrocruzamientos con el parental recurrente con selección para el rasgo, particularmente el rasgo de "resistencia a *Albugo candida* « de acuerdo con la presente invención, la progenie es heterocigótica para el locus que alberga la resistencia, pero es como el parental recurrente para la mayoría o casi todos los otros genes (véase, por ejemplo, Poehlman y Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4ª Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and 10 Technique, 360-376, incorporado aquí como referencia). La selección para el rasgo se realiza después de cada uno de los cruces. La esterilidad masculina está disponible en *Brassica*. En particular, la esterilidad citoplásmica masculina puede utilizarse en líneas comerciales, p. ej., líneas de coliflor de *Brassica oleracea*.

La población puede ser rastreada de diferentes maneras. En primer lugar, la población puede someterse a un rastreo utilizando un tamiz de enfermedades patológicas tradicional. Dichos tamices de enfermedades patológicas 15 son conocidos en la técnica. Específicamente, las plantas individuales o partes de las mismas pueden ser enfrentadas en una incubadora o invernadero a *Albugo candida* y se calificó a los fenotipos resultantes resistentes o susceptibles de cada una de las plantas. A modo de ejemplo, y no de limitación, las plantas pueden rastrearse en un invernadero de la siguiente manera.

En primer lugar, semillas de *Brassica* se siembran y se cultivan en plántulas (el tiempo aproximado es de 3-4 20 semanas) en un invernadero—evaluándose preferiblemente > 10 plantas por línea. Dado que la Resistencia no se expresa completamente en los cotiledones, por lo tanto, se utilizan hojas verdaderas (preferiblemente 3-4 fases foliares) para inocular las plantas. Las hojas pueden clasificarse por separado utilizando una escala de clasificación de enfermedades de 1-9 (1 a 5 = susceptible y 6 a 9 = resistente con sub-niveles de resistencia intermedia (6-7) y resistencia estándar (8-9)). La escala de la clasificación de la enfermedad depende de la presencia y el tamaño de 25 las pústulas de *Albugo candida* en las hojas.

Esporas de *Albugo candida* pueden recogerse con una bomba de vacío de pústulas maduras sobre el material afectado y almacenarse en seco a -20 °C (Gilijamse et al., 2004). Los esporangios se suspendieron en agua fría y se almacenaron durante 2 h a 5 °C para permitir que los esporangios germinen en zoosporas. Luego, las zoosporas se pueden pulverizar sobre las plantas de ensayo (concentración $10^4 - 10^5$ zoosporas/ml) en una cámara climática 30 con 100% de HR. Incubación durante 10-14 días a 18-20°C en un invernadero, tras lo cual comienzan a aparecer las pústulas blancas. La observación final se realiza utilizando una escala de 1-9, en la que 1 = las plantas están completamente cubiertas con pústulas grandes, y 9 = las plantas están sanas sin mostrar síntoma alguno. Las plantas con puntuaciones de 1-5 en esta escala se consideran susceptibles y las plantas con puntuaciones de 6-9 se clasifican como resistentes; 6-7 se considera como resistentes intermedios y 8-9 como resistentes estándar.

En segundo lugar, la selección asistida por marcadores se puede realizar utilizando uno o más de los marcadores 35 moleculares descritos anteriormente en esta memoria para identificar aquellas plantas híbridas que contienen uno o más de los genes que codifican la resistencia a *Albugo*. Alternativamente, la selección asistida por marcadores puede utilizarse para confirmar los resultados obtenidos del rastro de patologías. Las plantas híbridas F2 que exhiben un fenotipo resistente a *Albugo candida* contienen los genes requeridos que codifican la resistencia a 40 *Albugo*, y poseen características comercialmente deseables, luego se seleccionan y se autofecundan durante un cierto número de generaciones con el fin de permitir que la planta de *Brassica* se vuelva cada vez más endógama. Este proceso de autofecundación y selección continua se puede realizar durante cinco o más generaciones. El resultado de una reproducción y selección de este tipo es la producción de líneas que son genéticamente homogéneas para los genes asociados con la resistencia a *Albugo candida*, así como otros genes asociados con 45 rasgos de interés comercial. Alternativamente, se puede desarrollar una nueva y superior línea de plantas de *Brassica oleracea* endógamas resistentes a *Albugo candida* utilizando las técnicas de selección recurrente y retrocruzamiento. En este método, la resistencia a *Albugo candida* puede introgresarse en una planta receptora diana (que se denomina el parental recurrente) al cruzar el parental recurrente con una primera planta donante (que es diferente del parental recurrente y se menciona en esta memoria como el "parental no recurrente"). El parental recurrente es una planta que no es resistente o que tiene un bajo nivel de resistencia a *Albugo candida* y posee 50 características comercialmente deseables, tales como, pero no limitadas a resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, valiosas características agronómicas, etc.

El parental no recurrente exhibe resistencia a *Albugo candida* y contiene uno o más genes que codifican resistencia a *Albugo candida*. El parental no recurrente puede ser cualquier variedad de planta o línea endógama que tiene 55 fertilidad cruzada con el parental recurrente. La descendencia resultante de un cruce entre el parental recurrente y el parental no recurrente se retrocruza con el parental recurrente. La población de plantas resultante se rastrea después. La población puede ser rastreada de diferentes maneras. Primero, la población puede rastrearse utilizando un tamiz de patología tradicional tal como se describe anteriormente en esta memoria, particularmente en el EJEMPLO 1. En segundo lugar, la selección asistida por marcadores se puede realizar utilizando uno o más de 60 los marcadores moleculares descritos anteriormente en esta memoria para identificar aquella progenie que contiene uno o más de los genes que codifican la resistencia a *Albugo candida*. Alternativamente, la selección asistida por marcadores puede utilizarse para confirmar los resultados obtenidos del rastreo de patologías. Una vez que se

hacen las selecciones apropiadas, el proceso se repite. El procedimiento de retrocruzamiento al parental recurrente y la selección de la resistencia a *Albugo candida* se repite durante aproximadamente cinco o más generaciones. La progenie resultante de este proceso es heterocigótica para uno o más genes que codifican la resistencia a *Albugo candida*. La última generación de retrocruzamiento se autofecunda luego para proporcionar una progenie homocigótica de reproducción pura para la resistencia a *Albugo candida*. Las líneas de *Brassica oleracea* endógamas resistentes a *Albugo candida* descritas en esta memoria pueden utilizarse en cruces adicionales para crear plantas híbridas resistentes a *Albugo candida*. Por ejemplo, una primera planta de *Brassica oleracea* endógama resistente a *Albugo candida* se puede cruzar con una segunda planta de *Brassica oleracea* endógama que posee rasgos comercialmente deseables, tales como, pero no limitados a resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características agronómicas deseables, etc. Esta segunda línea de *Brassica* endógama puede o no ser resistente a *Albugo candida*. La selección asistida por marcadores utilizada en los métodos descritos anteriormente en esta memoria se puede realizar, por ejemplo, paso a paso, por lo que los diferentes genes resistentes a *Albugo candida* se seleccionan en más de una generación; o, como un ejemplo alternativo, simultáneamente, con lo que todos los genes de resistencia se seleccionan en la misma generación. La selección asistida por marcadores para la resistencia a *Albugo candida* se puede hacer antes, junto con, o después del ensayo y la selección de otros rasgos de entrada o salida comercialmente deseables.

Existen varios tipos de marcadores moleculares que se pueden utilizar en la selección basada en marcadores, que incluyen, pero no se limitan a polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmento de restricción amplificada (AFLP), repeticiones de secuencia simple (SSR) y polimorfismos de un solo nucleótido SNP.

El RFLP implica el uso de enzimas de restricción para cortar el ADN cromosómico en sitios de restricción cortos específicos; los polimorfismos resultan de duplicaciones o deleciones entre los sitios o mutaciones en los sitios de restricción.

La RAPD utiliza la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de baja rigurosidad con cebadores únicos de secuencia arbitraria para generar matrices específicas para cepas de fragmentos de ADN anónimos. El método requiere solo pequeñas muestras de ADN y analiza un gran número de loci polimórficos.

El AFLP requiere la digestión de ADN celular con una o más enzimas de restricción antes de utilizar la PCR y los nucleótidos selectivos en los cebadores para amplificar fragmentos específicos. Con este método, utilizando técnicas de electroforesis para visualizar los fragmentos obtenidos, se pueden medir hasta 100 loci polimórficos por combinación de cebador y solo se requiere una pequeña muestra de ADN para cada uno de los ensayos.

El análisis por SSR se basa en secuencias de microsatélites de ADN (repetición corta) que están muy dispersas por todo el genoma de los eucariotas, que se amplifican de forma selectiva para detectar variaciones en repeticiones de secuencias simples. Solo se requieren pequeñas muestras de ADN para un análisis por SSR. Los SNP utilizan ensayos de extensión por PCR que detectan de manera eficiente las mutaciones puntuales. El procedimiento requiere poco ADN por muestra. Uno o dos de los métodos anteriores se pueden utilizar en un programa típico de reproducción basada en marcadores.

El método más preferido para lograr la amplificación de fragmentos de nucleótidos que abarcan una región polimórfica del genoma de la planta emplea la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") (Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263 273 (1986)), utilizando pares de cebadores que incluyen un cebador directo y un cebador inverso que son capaces de hibridar con las secuencias proximales que definen un polimorfismo en su forma de doble cadena.

Se pueden emplear métodos alternativos para amplificar fragmentos, tales como la "Reacción en Cadena de la Ligasa" ("LCR") (Barany, Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 88:189 193 (1991)), que utiliza dos pares de sondas de oligonucleótidos para amplificar exponencialmente una diana específica. Las secuencias de cada uno de los pares de oligonucleótidos se seleccionan para permitir que el par se hibride con secuencias adyacentes de la misma cadena de la diana. Una hibridación de este tipo forma un sustrato para una ligasa dependiente del molde Al igual que con la PCR, los productos resultantes sirven así como un molde en ciclos subsiguientes y se obtiene una amplificación exponencial de la secuencia deseada.

La LCR se puede realizar con oligonucleótidos que tienen las secuencias proximal y distal de la misma cadena de un sitio polimórfico. En una realización, cualquiera de los oligonucleótidos se diseñará para que incluya el sitio polimórfico real del polimorfismo. En una realización de este tipo, las condiciones de reacción se seleccionan de manera que los oligonucleótidos pueden ligarse juntos solo si la molécula diana contiene o carece del nucleótido específico que es complementario del sitio polimórfico presente en el oligonucleótido. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden seleccionarse de manera que no incluyan el sitio polimórfico (véase, Segev, Solicitud PCT WO 90/01069).

Un método adicional que puede emplearse alternativamente es el "Ensayo de ligamiento de oligonucleótidos" ("OLA") (Landegren et al., Science 241:1077 1080 (1988)). El protocolo OLA utiliza dos oligonucleótidos que están diseñados para ser capaces de hibridarse con secuencias adyacentes de una sola cadena de una diana. La OLA, al

igual que la LCR, es particularmente adecuada para la detección de mutaciones puntuales. Sin embargo, a diferencia de la LCR, la OLA da como resultado una amplificación "lineal" en lugar de exponencial de la secuencia diana.

5 Aún otro método que puede emplear alternativamente es el "Ensayo invasor" que utiliza una endonucleasa flap específica para la estructura (FEN) para escindir un complejo tridimensional formado por la hibridación de oligonucleótidos solapantes específicos para el alelo para un ADN diana que contiene un sitio de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). La reasociación del oligonucleótido complementario al alelo de SNP en la molécula diana desencadena la escisión del oligonucleótido por escisión, una FEN termoestable. La escisión puede ser detectada por varios enfoques diferentes. Lo más comúnmente, el producto de escisión desencadena una reacción de escisión secundaria en un casete de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para liberar una señal fluorescente. Alternativamente, la escisión se puede detectar directamente mediante el uso de sondas de polarización de fluorescencia (FP), o por espectrometría de masas. La reacción de escisión invasiva es altamente específica, tiene una tasa de fracaso baja y puede detectar cantidades de zeptomol de ADN diana. Mientras que el ensayo se ha utilizado tradicionalmente para interrogar a un SNP en una muestra por reacción, se han sometido a ensayo nuevos enfoques basados en chips o perlas para hacer que este ensayo eficiente y preciso sea adaptable a la multiplexación y al genotipado de SNP de alto rendimiento.

Nickerson et al. han descrito un ensayo de detección de ácido nucleico que combina atributos de PCR y OLA (Nickerson et al., Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.). 87:8923 8927 (1990)). En este método, la PCR se utiliza para lograr la amplificación exponencial del ADN diana, que luego se detecta utilizando OLA.

20 También se conocen esquemas basados en el ligamiento de dos (o más) oligonucleótidos en presencia de un ácido nucleico que tiene la secuencia del "di-oligonucleótido" resultante, amplificando con ello el di-oligonucleótido (Wu et al., Genomics 4:560 569 (1989)), y puede adaptarse fácilmente a los propósitos de la presente invención.

En una realización, la presencia o ausencia de un fragmento de ADN amplificado es indicativa de la presencia o ausencia del rasgo en sí mismo o de un alelo particular del rasgo. En una realización, una diferencia en la longitud o secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN amplificado es indicativa de la presencia de un alelo particular de un rasgo y, por lo tanto, permite distinguir entre diferentes alelos de un rasgo.

En una realización específica de la invención, pueden utilizarse marcadores de repetición de secuencia simple (SSR) para identificar alelos relevantes para la invención en las plantas parentales y/o sus ancestros, así como en las plantas de progenie que resultan de un cruce de dichas plantas parentales. Las repeticiones de secuencias simples son secuencias de ADN cortas y repetidas, y están presentes en los genomas de todos los eucariotas y consisten en varias a más de cien repeticiones de un motivo de nucleótido dado. Dado que el número de repeticiones presentes en una ubicación particular en el genoma a menudo difiere entre las plantas, las SSR pueden analizarse para determinar la ausencia o presencia de alelos específicos.

En otra realización de la invención, se utilizarse marcadores de SNP para identificar alelos relevantes para la invención en las plantas parentales y/o sus ancestros, así como en las plantas de progenie que resultan de un cruce de dichas plantas parentales.

En la presente invención, se puede utilizar un marcador o un conjunto de dos o más marcadores representados por un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, o cualquier marcador adyacente que esté estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, co-segregado con el rasgo de resistencia a *Albugo candida*, cuyos cebadores conducen a un producto de amplificación en una reacción de PCR que exhibe un peso molecular o una secuencia de nucleótidos, que es esencialmente idéntica o que puede considerarse como un alelo a la de un producto de amplificación por PCR correspondiente que se puede obtener de *Brassica oleracea* L var *gemmifera* UK 925, cuyas semillas están depositadas bajo el Número de depósito NCIMB 41654 en una reacción de PCR con el o los pares de cebadores idénticos.

En una primera etapa, muestras de ADN o ADNc se obtienen a partir de material vegetal adecuado, tal como tejido foliar, extrayendo ADN o ARN utilizando técnicas conocidas. Los cebadores que flanquean una región que contiene marcadores dentro del locus de rasgos cualitativos relevantes para la invención, descritos en esta memoria delante o dentro de una región vinculada al mismo, se utilizan entonces para amplificar la muestra de ADN utilizando el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), bien conocido por los expertos en la técnica.

Básicamente, el método de amplificación por PCR implica el uso de un cebador o un par de cebadores que comprenden dos secuencias de cebadores de oligonucleótidos cortas que flanquean el segmento de ADN a amplificar o secuencias de adaptador ligadas a dicho segmento de ADN. Ciclos repetidos de calentamiento y desnaturalización del ADN son seguidos por la reasociación de los cebadores a sus secuencias complementarias a bajas temperaturas, y la extensión de los cebadores reasociados con ADN polimerasa. Los cebadores se hibridan a cadenas opuestas de las secuencias diana de ADN. La hibridación se refiere a la reasociación de las cadenas de ADN complementarias, en que complementaria se refiere a la secuencia de los nucleótidos, de manera que los nucleótidos de una cadena pueden unirse con los nucleótidos en la cadena opuesta para formar estructuras de

doble cadena. Los cebadores están orientados de modo que la síntesis de ADN por la polimerasa se realiza de manera bidireccional a través de la secuencia de nucleótidos entre los cebadores. Este procedimiento duplica de manera efectiva la cantidad de ese segmento de ADN en un ciclo. Debido a que los productos de la PCR son complementarios y capaces de unirse a los cebadores, cada uno de los ciclos sucesivos duplica la cantidad de ADN sintetizado en el ciclo precedente. El resultado de este procedimiento es la acumulación exponencial de un fragmento diana específico, que es aproximadamente $2^{<n>}$, en que n es el número de ciclos.

A través de la amplificación por PCR, se hacen millones de copias del segmento de ADN flanqueado por los cebadores. Las diferencias en el número de secuencias repetidas o inserciones o deleciones en la región que flanquea dichas repeticiones, que están situadas entre los cebadores flanqueantes en diferentes alelos, se reflejan en las variaciones de longitud o secuencia de los fragmentos de ADN amplificados. Estas variaciones pueden detectarse, por ejemplo, separando electroforéticamente los fragmentos de ADN amplificados en geles o utilizando un secuenciador capilar. Al analizar el gel o perfil, se puede determinar si la planta contiene el alelo deseado en un estado homocigoto o heterocigoto o si el alelo deseado o no deseado está ausente del genoma de la planta.

En la alternativa, la presencia o ausencia del alelo deseado se puede determinar mediante PCR en tiempo real utilizando colorantes de ADN de doble cadena o el método de la sonda informadora fluorescente.

El análisis de marcadores se puede hacer temprano en el desarrollo de la planta utilizando muestras de ADN extraídas del tejido foliar de plantas muy jóvenes o de semillas. Esto permite identificar plantas con una composición genética deseable temprano en el ciclo de reproducción y descartar plantas que no contienen los alelos deseados relevantes para la invención antes de la polinización, reduciendo así el tamaño de la población reproductora y reduciendo los requisitos de fenotipado.

Además, mediante el uso de marcadores moleculares, se puede hacer una distinción entre plantas homocigotas que portan dos copias del alelo deseado, relevante para la invención, en el locus cualitativo de la resistencia a *Albugo candida* y plantas heterocigotas que portan solo una copia y plantas que no contienen copia alguna del o de los alelos favorables.

Por lo tanto, se pueden desarrollar marcadores alternativos por métodos conocidos por el experto en la técnica y se utilizan para identificar y seleccionar plantas con un alelo o un conjunto de alelos de un locus o loci de rasgo cualitativo de acuerdo con la presente invención y como se describe en esta memoria anteriormente.

Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden obtener la secuencia de nucleótidos del producto de amplificación obtenido en la amplificación por PCR utilizando un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2 y nuevos cebadores o pares de cebadores diseñados en base a la nueva secuencia de nucleótidos determinada del producto de amplificación por PCR. Además, los marcadores de acuerdo con la invención y descritos anteriormente en esta memoria podrían colocarse en un mapa genético de una planta de *Brassica* cultivada, en particular especies de la familia *Brassica oleracea*, y el mapeo de marcadores conocidos en la misma región o regiones homólogas u ortólogas podría ser utilizado como punto de partida para el desarrollo de nuevos marcadores.

El análisis conjunto de datos genotípicos y fenotípicos se puede realizar utilizando un software estándar conocido por los expertos en la técnica. Las introducciones de plantas y el germoplasma pueden rastrearse en cuanto a los alelos en el locus de resistencia a *Albugo candida* correspondiente descrito en esta memoria, en base a la o las secuencias de nucleótidos del o de los marcadores en el locus/los loci del marcador vinculados a dicho locus de resistencia de *Albugo candida*, y el peso molecular del o de los alelos utilizando una o más de las técnicas descritas en esta memoria o conocidas por los expertos en la técnica.

Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislada (preferiblemente ADN, pero no limitado a ADN) que comprende un locus de resistencia a *Albugo candida* de la presente divulgación, o una parte de la misma que confiere resistencia. Por lo tanto, los marcadores descritos se pueden utilizar para la identificación y el aislamiento de uno o más marcadores o genes de *Brassica oleracea* u otros cultivos vegetales dentro del género *Brassica* que están vinculados o codifican la resistencia a *Albugo candida*.

También, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un kit para la detección del locus de resistencia a *Albugo candida* en *Brassica oleracea*, comprendiendo dicho kit un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR capaces de amplificar un marcador de ADN vinculado al locus de resistencia a *Albugo candida*.

En un aspecto particular, en dicho kit, dicho marcador de ADN puede ser amplificado en una reacción de PCR mediante la amplificación de un fragmento de ADN con un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR representada por un cebador directo de SEQ ID N° 1 y un cebador inverso de SEQ ID N° 2), y dicho fragmento de ADN comprende al menos un marcador de SNP seleccionado dentro del grupo que comprende:

- i. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos T a C en la posición 134 en el producto amplificado por PCR,

- ii. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos C a T en la posición 108 en el producto amplificado por PCR
- iii. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos T a C en la posición 366 en el producto amplificado por PCR

5 En SNP A, C corresponde a alelo resistente y T a alelo susceptible.
 En SNP B, T corresponde a alelo resistente y C a alelo susceptible.
 En SNP C, C corresponde a alelo resistente y T a alelo susceptible.

Más particularmente, en un kit de acuerdo con la presente divulgación,, el SNP A puede identificarse con un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR representados por un cebador directo de SEQ ID N° 3 y un cebador inverso de SEQ ID N° 4 y una sonda de ADN de SED ID N° 5 que define el alelo resistente.

La presente invención proporciona también un marcador de ADN que está vinculado al locus de resistencia a *Albugo candida* en *Brassica oleracea* y se puede identificar en una reacción de PCR mediante la amplificación de un fragmento de ADN con un par de cebadores de oligonucleotídicos de PCR representados por un cebador directo de SEQ ID N° 1 y un cebador inverso de SEQ ID N° 2), y dicho fragmento de ADN comprende al menos un marcador de SNP seleccionado dentro del grupo que comprende:

- i. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos T a C en la posición 134 en el producto amplificado por PCR,
- ii. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos C a T en la posición 108 en el producto amplificado por PCR
- iii. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos T a C en la posición 366 en el producto amplificado por PCR

La invención proporciona también un marcador de ADN, en donde el SNP A puede identificarse con un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR representados por un cebador directo de SEQ ID N° 3 y un cebador inverso de SEQ ID N° 4 y una sonda de ADN de SED ID N° 5 que define el alelo resistente.

25 En una realización, la presente invención también se refiere al uso de un marcador de ADN de acuerdo con los párrafos anteriores para la selección diagnóstica del locus de resistencia a *Albugo candida* en la planta de *Brassica oleracea*.

Además, la invención proporciona el uso de marcador de ADN de acuerdo con las realizaciones mencionadas anteriormente para la identificación en una planta de la presencia del locus de resistencia a *Albugo candida* y/o para la vigilancia de la introgresión del locus de resistencia a *Albugo candida* en plantas de *Brassica oleracea* cultivadas.

En un aspecto, la presente divulgación describe plantas de *B. oleracea* cultivadas resistentes a *Albugo candida* y resistentes, además a la hernia de la col, en donde la resistencia a la hernia de la col es monogénica y dominante, incluyendo semillas y materiales de dichas plantas y la progenie de las mismas.

La presente divulgación proporciona, por lo tanto, una planta de *Brassica oleracea* cultivada resistente a *Albugo candida* de acuerdo con cualquiera de los aspectos descritos en esta memoria, caracterizada, además, porque dicha planta es resistente a la enfermedad de la hernia de la col, en donde la resistencia a la hernia de la col es monogénica y dominante

Plantas de *Brassica oleracea* resistentes a la hernia de la col y el método para obtenerlas se describen en el documento EP1525317 titulado Plantas de *Brassica* resistentes a la hernia de la col.

40 La presente divulgación también describe métodos para producir plantas de *B. oleracea* resistentes a *Albugo candida* y, además, resistentes a la hernia de la col, métodos para transferir la resistencia a la hernia de la col a plantas de *B. oleracea* susceptibles o menos resistentes a la hernia de la col que son resistentes a *Albugo candida*.

Albugo candida afecta principalmente a las hojas, mientras que *Plasmodiophra brassicae* ataca principalmente las raíces de *Brassica oleracea*. Por lo tanto, es ventajoso obtener una planta de *Brassica oleracea* que tenga resistencia combinada contra ambos patógenos con el fin de asegurar un crecimiento adecuado de la planta desde las raíces hasta las hojas.

Se obtienen mayores rendimientos debido a la ausencia de enfermedades en plantas resistentes. Además, se requieren mucho menos productos químicos de protección de cultivos o ningún producto químico de protección de cultivos contra la hernia de la col y contra *Albugo candida* cuando se cultivan plantas de *B. oleracea* de la presente divulgación.

La presente divulgación describe, por lo tanto:

Una planta de *B. oleracea* resistente a la enfermedad de la hernia de la col, más particularmente a la enfermedad de la hernia de la col provocada por el patógeno *Plasmodiophora brassicae* y resistente a Albugo candida.

5 En un aspecto específico de la invención, la resistencia a la enfermedad de la hernia de la col es monogénica y dominante.

10 En otro aspecto preferido, la planta de *B. oleracea* que tiene resistencia combinada contra la enfermedad de la hernia de la col y contra Albugo candida es brócoli, repollo blanco, coliflor, coles de Bruselas, col crespita, Savoy o col lombarda. En otro aspecto preferido, la planta de *B. oleracea* es homocigótica o heterocigótica para la resistencia a la hernia de la col. En otro aspecto preferido, la resistencia a la hernia de la col está vinculada genéticamente a un marcador molecular. Preferiblemente, el marcador molecular se puede obtener mediante amplificación por PCR.

La presente divulgación describe, además:

Semilla de una planta de Brassica oleracea que es resistente a Albugo candida y resistente a la enfermedad de la hernia de la col, incluida su progenie, en donde dicha semilla o progenie comprende las resistencias de la presente divulgación.

15 En otro aspecto preferido, dicha resistencia a la hernia de la col es monogénica, preferiblemente monogénica y dominante. En un aspecto preferido, la planta de *B. oleracea* es homocigótica para la resistencia a la hernia de la col. En otro aspecto preferido, la planta de *B. oleracea* es heterocigótica para la resistencia a la hernia de la col.

La presente divulgación describe, además:

20 Semilla de una planta arriba descrita, incluyendo su progenie, en donde dicha semilla o progenie comprende las resistencias contra Albugo candida y la hernia de la col de acuerdo con la presente invención.

La presente divulgación describe, además:

Un método para producir una planta de *B. oleracea* resistente a Albugo candida que comprende, además, una resistencia monogénica y dominante a la hernia de la col, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una Brassica oleracea resistente a Albugo candida,
- 25 b) obtener una planta de *B. rapa* resistente a la hernia de la col,
- c) cruzar dicha planta de *B. rapa* con la planta de *B. oleracea* resistente a Albugo candida,
- d) rescatar embriones resultantes del cruce de la etapa c),
- e) regenerar una planta a partir de un embrión de la etapa d),
- f) seleccionar una planta de la etapa e) que sea resistente a la hernia de la col y resistente a Albugo candida,
- 30 g) retrocruzar una planta resultante de la etapa f) con una planta de *B. oleracea* resistente a Albugo candida.

En un aspecto preferido, el método comprende, además, introgresar la resistencia en una élite de *B. oleracea* endógama que es resistente a Albugo candida. En otro aspecto preferido, el método comprende, además, cruzar dicha endogamia con otra *B. oleracea* endógama para producir un híbrido.

35 La descripción anterior se entenderá más completamente con la referencia a los siguientes Ejemplos. Dichos Ejemplos son, sin embargo, métodos a título de ejemplo para poner en práctica la presente invención.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1: Ensayos de enfermedades utilizados para testar la presencia de la resistencia

40 La resistencia no se expresa completamente en los cotiledones y, por lo tanto, se utilizan hojas verdaderas (preferiblemente en la fase de 3-4 hojas) para inocular las plantas. Las plantas se plantan en un suelo de turba normal en el invernadero en bandejas. Después de 7-10 días después de la siembra, las plántulas se trasplantan en macetas de 9 x 9 x 8 cm llenas de suelo de turba normal y se cultivan durante 3-4 semanas en un invernadero a temperaturas moderadas (18-20 °C, noche-día). Cuando las primeras 3-4 hojas están completamente desarrolladas, las plantas pueden ser inoculadas.

45 Esporas se recogieron con una bomba de vacío de pústulas maduras y se almacenaron en seco a -20 °C (Gilljamse et al., 2004). Los esporangios se suspendieron en agua fría y se almacenaron durante 2 h a 5 °C para permitir que los esporangios germinen en zoosporas. Luego, las zoosporas se pulverizaron sobre las plantas de ensayo (concentración $10^4 - 10^5$ zoosporas/ml) en una cámara climática con 100% de HR. Incubación durante 10-14 d a

18-20°C en un invernadero, tras lo cual comienzan a aparecer pústulas blancas. La observación final se realiza utilizando una escala de 1-9, en la que 1 = las plantas están completamente cubiertas con pústulas grandes, y 9 = las plantas están sanas sin mostrar síntoma alguno (Tabla 1). Las plantas con puntuaciones de 1-5 en esta escala se consideran susceptibles y las plantas con puntuaciones de 6-9 se clasifican como resistentes; 6-7 se considera como resistentes intermedios y 8-9 como resistentes estándar.

5

Tabla 1: Escala para puntuación de resistencia contra *Albugo candida*

escala	S/R	Sin pústulas	% de hoja cubierta con pústulas
1	S	> 50 pústulas grandes	>80%
2	S	30-50 pústulas grandes	50-80%
3	S	15-30 pústulas grandes	20-50%
4	S	5-15 pústulas grandes	5-20%
5	S	1-5 pústulas grandes y/o > 20 pústulas pequeñas	1-5%
6	R	5-20 pústulas pequeñas	0,1-1%
7	R	1-5 pústulas pequeñas	<0,1%
8	R	sin pústulas, solo HR	0%
9	R	sin síntomas	0%

S=susceptible, R= resistente

Ejemplo 2: Transferencia de la resistencia de *Albugo candida* a *B. oleracea*.

En 2001, se identificó que las plantas individuales de una col portuguesa (acceso HRI 12105, *Brassica oleracea* acephala salvaje; Couve Galega Frisada) tienen resistencia contra *Albugo candida*. Estas plantas se autofecundaron para fijar la resistencia y luego se retrocruzaron adicionalmente con líneas de élite de repollo, coles de B., coliflor y brócoli para introgresar la resistencia.

10

En las coles de Bruselas, una línea parental 1 se convirtió con la resistencia a *Albugo candida* al cruzarla con HRI 12105. Al cabo de 3 generaciones de retrocruzamientos, B3 se segregó bien 1:1 (Tabla 1, grupo de 2 líneas). Después de 4 ciclos de endogamia (B3F4) se obtuvo una línea casi isogénica (que se asemeja fenotípicamente a la línea parental 1 de las coles de Bruselas) con resistencia a *Albugo candida*. Esta línea era 100% resistente. Se realizaron dos cruces de ensayo, uno dio plantas resistentes al 100% y el otro plantas resistentes al 97%.

15

Esta línea resistente al 100% se cruzó luego con una línea femenina que contenía CMS con el fin de obtener la UK 925 *Brassica oleracea* L var gemmifera, cuya semilla está depositada bajo el Número de depósito NCIMB 41654.

20

En otra línea de fondo recurrente de coles de Bruselas, el B1 se segregó también muy bien en 1:1 (Tabla 1).

Utilizando un fondo de repollo blanco, un B1 reveló una segregación 1:1, una línea fija mostró un 100% de resistencia al igual que la F1 de ensayo. Una B0 y B1 en coliflor segregaron 1:1.

25

Estos ejemplos son indicativos de muchos más retrocruzamientos en coles de Bruselas, el repollo, la col Savoy, el brócoli y otros cultivos de *Brassica oleracea* cultivados. Al clasificar los retrocruzamientos en la Tabla 1, está presente una segregación S:R = 1:1 (Chi cuadrado, P > 0,05) indicativa de un solo gen (semi) dominante. Los datos también demuestran que es posible la introgresión en diferentes cultivos con el fin de establecer la resistencia a *Albugo candida* en diferentes especies de *Brassica oleracea* cultivadas, tales como el brócoli, la coliflor, el repollo blanco, la col Savoy y las coles de Bruselas.

30

Tabla 2: Resultados de la enfermedad de programas de retrocruzamientos en las coles de Bruselas (BS) y el repollo blanco (WC).

Planta	generación					Media Puntuación
		S	R	% de S	% de R	
Línea parental 1 (BS)	F12	48	0	100	0	4,9
Línea parental 1 con resistencia a <i>Albugo candida</i>	B3F4	0	48	0	100	8,1

Línea parental (WC)	F10	15	0	100	0	3,9
Línea fija con resistencia a <i>Albugo candida</i>	B4F3	0	24	0	100	8,0
F1 de ensayo	F1	0	24	0	100	7,8

Abrev: S=susceptible, R=resistente (puntuación 6-9, véase la Tabla 1). BS = coles de Bruselas, WC = repollo blanco; Media = media de la puntuación de *Albugo candida* (de acuerdo con la Tabla 1).

5 Se realizaron experimentos similares con coliflor y brócoli, y se demostró que la introgresión del rasgo de resistencia a *Albugo candida* se puede lograr cruzando y retrocruzando con la fuente de resistencia con el fin de seleccionar y producir plantas de *Brassica oleracea* con resistencia a *Albugo candida*.

Ejemplo 3: Desarrollo de marcadores moleculares

Se utilizaron líneas isogénicas cercanas (NIL) de repollo blanco y coles de Bruselas con introgresión del gen de resistencia a *Albugo candida* HRI1215 para la identificación de Marcadores Moleculares vinculados con la resistencia a la enfermedad de *Albugo candida*.

10 Para identificar nuevos marcadores vinculados a la resistencia a *Albugo candida* de HRI1215, el ADN de las líneas isogénicas cercanas (NIL) derivadas de un B3F3 se hibridaron a una matriz affymetrix de *Brassica*. Los homólogos de *Arabidopsis* de SFP candidata con señales de hibridación significativamente diferentes entre los NIL resistentes y susceptibles. Las posiciones genómicas de los homólogos de *Arabidopsis* para un gran número de candidatos se agruparon en un bloque del cromosoma 5 que es sinténico a la región del cromosoma 2 de *B. oleracea*, en que se localiza la resistencia a *Albugo candida*. Estos candidatos se secuenciaron en un panel específico para rasgos de líneas fijas, resistentes y susceptibles para identificar polimorfismos para el desarrollo del ensayo Taqman. Un homólogo de At5g17610 portaba polimorfismos de SNP portados que se correlacionaban con la segregación de la resistencia tanto en las coles de Bruselas como en el repollo.

Secuenciación por PCR para SNP A, SNP B y SNP C.

20 Cebador directo (SEQ ID N° 1)

5' CACGACGTTGTA AACGACAAGAGAATTGTGCGCTGC 3'

Cebador inverso (SEQ ID N° 2)

5' CAGGAAACAGCTATGACCAAAAGCTGCCACGAACAC 3'

25 El conjunto de cebadores amplifica una secuencia que contiene SNP en las posiciones 108 (SNP A), 134 (SNP B) y 366 (SNP C). Las muestras resistentes y susceptibles se genotiparon mediante secuenciación de los productos de la PCR obtenidos por el conjunto de cebadores. La secuenciación se realizó utilizando una reacción de secuenciación de Sanger, seguida de electroforesis capilar.

La prueba de un panel de verificación reveló así que los siguientes SNP se co-segregan con la resistencia:

30 SNP A muestra un alelo resistente con una sustitución de C por T en la posición 134 en el producto amplificado; correspondiendo C a resistente.

SNP B muestra un alelo resistente con una sustitución de T por C en la posición 108 en el producto amplificado; correspondiendo T a resistente.

SNP C muestra un alelo resistente con una sustitución de C por T en la posición 366 en el producto amplificado; correspondiendo C a resistente.

Ensayo TaqMan para SNP A

El protocolo de ensayo Taqman ha sido desarrollado para detectar la resistencia a *Albugo candida* (ampolla blanca) introgresada de HRI1215. Este ensayo co-dominante se puede aplicar en la reproducción de *Brassica oleracea* para la transferencia y selección de la resistencia a *Albugo candida* en brócoli, coliflor, repollo, coles de Bruselas y coles.

40 Para SNP A, se desarrolló un ensayo TaqMan con el fin de permitir una determinación más rápida de individuos resistentes frente a susceptibles.

La distancia de enlace entre el ensayo SNP A y el locus de resistencia se estimó en 1,5 cM. El locus fue mapeado en el cromosoma 2.

Cebador directo (SEQ ID N° 3)

ES 2 739 921 T3

5' **CACCATCTAGGCTCTCCCGAGC** 3'

Cebador inverso (SEQ ID N° 4)

5' **GGAGCCAAGAATACAAATATTGTATGTAC** 3'

Sondas:

- 5 FAM - **TCATGTTTCGTCCTAGTATAC** - MGB – NFQ > Específica resistente (SEQ N° 5)
 VIC - **CTAATCATGTTTCGTTCTTC** - MGB – NFQ > Específica susceptible (SEQ N° 6)

Condiciones del ensayo

1. Aislar el ADN genómico con el protocolo de aislamiento de ADN estándar (acetato de potasio) y resuspender en 100 µL de TE;
- 10 2. Diluir el ADN del molde a 1/30;
3. Pipetear 4 µL de cada una de las muestras de ADN diluido en los pocillos individuales;
4. Cubrir y centrifugar la placa y colocar en hielo;
5. Hacer la mezcla la mezcla maestra.

Protocolo Sigma	Volumen (µL)	Concentración inicial	Concentración final
g ADN	4,00		
Tampón 10x (Sigma)	1,00	10 X	1X
MgCl ₂	1,20	25 mM	3mM
dNTP (2,5 mM cada uno = 10 mM todos)	0,80	2,5 mM cada uno	0,2 mM cada uno
Sigma Taq	0,132	2,5U/µL	0,033 U/µl
HiNK12509 = SO0005AA1FM	0,10	10µM	100nM
HiNK12508 = SO0005AA2VC	0,10	10µM	100nM
HiNK12506 = SO0005AF1	0,45	10µM	450nM
HiNK12507 = SO0005AR1	0,45	10µM	450nM
ROX	0,10	50X	0,5X
H ₂ O QSP	1,668		
Volumen Total	10,00		

6. Cargar la placa en la máquina de PCR;
- 15 7. Programar la PCR (en el formato de placa ABI Geneamp PCR 9700- 384) de la siguiente manera:
 - 2 min 94°C para Sigma Taq Polimerasa
 - 15 s 94°C } 40X
 - 1 min 60°C }
 - 5 min 72°C }
- 20 8. Leer la placa en ABI7900.

DEPÓSITO

La siguiente muestra de semilla de *Brassica oleracea* L var gemmifera fue depositada en NCIMB, Ferguson Building, Craibstone Estate, bucksbum, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, Reino Unido, el día 16 de septiembre de 2009 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest a nombre de Syngenta Participaciones AG:

5 UK 925, Número de depósito NCIMB 41654, fecha de depósito 16 de septiembre de 2009.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SYNGENTA PARTICIPATIONS AG
 Linders, Rico
 10 Briggs, Bill
 Wijinker, Thaam
 van der Ploeg, Sjaak

<120> Nuevas plantas de Brassica resistentes a enfermedades

<130> 72625 EP/EPA

15 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 37
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo

<400> 1
 cagcagcttg taaaacgaca agagaattgt gcgctgc 37

25 <210> 2
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 30 <223> Cebador inverso

<400> 2
 caggaaacag ctatgaccaa aagctgccac gaacac 36

<210> 3
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo

<400> 3
 40 caccatctag gctctccccg agc 23

<210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador inverso

<400> 4
 ggagccaaga atacaatat tgtatgtac 29

<210> 5

ES 2 739 921 T3

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

5 <220>
<223> Sonda específica resistente

<400> 5
tcatgttcg tcctagtata c 21

10 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda específica susceptible

15 <400> 6
ctaatcatgt ttcgttctc 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un marcador de ADN que está vinculado a un locus monogénico y semi-dominante de resistencia a *Albugo candida* en el cromosoma 2 en *Brassica oleracea* y se puede identificar en una reacción de PCR mediante la amplificación de un fragmento de ADN con un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR representados por un cebador directo de SEQ ID N° 1 y un cebador inverso de SEQ ID N° 2, y dicho fragmento de ADN comprende al menos un marcador de SNP seleccionado dentro del grupo que comprende:
- 10 i. un SNP A representado por un intercambio de nucleótidos T a C en la posición 134 en el producto amplificado por PCR,
- ii. un SNP B representado por un intercambio de nucleótidos C a T en la posición 108 en el producto amplificado por PCR,
- 15 iii. un SNP C representado por un intercambio de nucleótidos T a C en la posición 366 en el producto amplificado por PCR
2. Uso de un marcador de ADN de acuerdo con la reivindicación 1 para la selección diagnóstica de un locus monogénico y semi-dominante de resistencia a *Albugo candida* en el cromosoma 2 en la planta de *Brassica oleracea*.
3. Uso del marcador de ADN de acuerdo con la reivindicación 1 para identificar en una planta la presencia de un locus monogénico y semi-dominante de resistencia a *Albugo candida* en el cromosoma 2 y/o para vigilar la introgresión de un locus monogénico y semi-dominante de resistencia a *Albugo candida* en el cromosoma 2 en una planta de *Brassica oleracea*.