

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 966**

51 Int. Cl.:

**A01H 5/08** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2010 PCT/EP2010/061858**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11020797**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2010 E 10742507 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2467487**

54 Título: **Plantas de tomate resistentes a enfermedades**

30 Prioridad:

**17.08.2009 EP 09167980**

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

**24.03.2020**

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)  
Rosentalstrasse 67  
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BONNET, GREGORI;  
GRIVET, LAURENT y  
SMETS, BERNARD**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 749 966 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Plantas de tomate resistentes a enfermedades

La presente descripción se refiere a plantas de tomate, en particular a plantas de tomate cultivadas que son resistentes al hongo patógeno *Botrytis cinerea*, a métodos para producir dichas plantas, y al uso de las mismas.

- 5 El tizón de *Botrytis*, comúnmente conocido como moho gris, provoca una diversidad de enfermedades de las plantas que incluyen el mal del talluelo y el marchitamiento de flores, frutos, tallos y follaje de muchas hortalizas y plantas ornamentales. Es una causa importante de podredumbre post-cosecha de productos vegetales perecederos, incluidos los tomates en la cosecha y en el almacenamiento. La enfermedad puede ocurrir tanto en el invernadero como en el campo.
- 10 El moho gris es provocado por el hongo *Botrytis cinerea*. Las esporas unicelulares son transportadas en conidióforos ramificados, de los cuales las esporas se liberan para ser transportadas por el viento. El hongo se establece a menudo en los tejidos lesionados y puede persistir como un saprófito durante largos períodos. Las lesiones del tallo en las plántulas de tomate pueden ocurrir al nivel del suelo o justo debajo de este. Los tallos pueden infectarse a través de cicatrices en hojas, hojas muertas o cualquier forma de daño en el tallo. Las lesiones del tallo a menudo rodean parcialmente el tallo, pero a veces se ve afectado todo el tallo y muere la planta. En los invernaderos, la infección por *Botrytis* es de particular importancia. De hecho, en el caso de los tomates indeterminados que necesitan tutoría, la eliminación de las hojas laterales que acompañan al crecimiento de la planta siempre conduce a lesiones en el tallo y estas lesiones constituyen múltiples puntos de entrada para el patógeno. Las lesiones de los peciolo parecen muy similares a las del tallo y, a menudo, son el resultado de la infección y la colonización de un foliolo. Las lesiones de los folíolos comienzan a menudo con tejido senescente o cualquier lesión física o química. Cuantas más lesiones estén presentes en la planta, más riesgos corre la planta de verse afectada por *Botrytis cinerea*.

En el campo el hongo aparece como una cubierta gris aterciopelada de esporas de *flores moribundas* y en el cáliz de los frutos. El fruto verde inmaduro se vuelve de color pardo claro o blanco, comenzando en el punto en donde tocan otras partes infectadas de la planta. Se puede desarrollar una putrefacción suave, permaneciendo la piel del fruto intacta, pero el tejido interno se vuelve meloso y acuoso. Más tarde, se desarrolla un moho gris difuso y pueden aparecer esclerocios. El fruto verde también puede infectarse directamente por esporas transportadas por el viento en lugar de por contacto con otras infecciones.

No existe resistencia conocida a *B. cinerea* en cultivares de tomate.

- 30 En Nicot et al ("Differences in susceptibility of pruning wounds and leaves to infection by *Botrytis cinerea* among wild tomato accessions" (Nicot, P. C., 2 Moretti A., 1 Romiti, C., 1 Bardin, M., 2 Caranta C., 1 Ferrière H. INRA - Report of the Tomato Genetics Cooperative Number 52 - septiembre de 2002)), se evaluaron alrededor de 20 accesiones de tomate silvestre para determinar la resistencia a *Botrytis cinerea*, particularmente en lesiones de tallo y hojas. Al comparar estas 20 accesiones con *Solanum lycopersicum* se observó una reducción de los síntomas, especialmente para las accesiones *L. chmielewski* 731089 y *L. chilense* LA7969. Sin embargo, Nicot et al no informan de identificación o integración de determinante genético alguno relacionado con esta resistencia.

En las operaciones de efecto invernadero, el control efectivo se puede lograr mediante la prevención de condiciones de predisposición (humedad relativa alta y temperaturas frías), por separación y la poda adecuada para fomentar la ventilación, por un manejo cuidadoso para evitar lesiones, y mediante la eliminación de las fuentes de inóculo a través de saneamiento de planta adecuado.

En el campo, este hongo es difícil de controlar debido a que provoca infecciones que permanecen latentes en el campo y se desarrollan en la decadencia de frutos durante el almacenamiento post-cosecha. No son infrecuentes pérdidas de cosechas de hasta el 50%. Las estrategias químicas para controlar *Botrytis* son limitadas debido a la alta variabilidad genética del hongo que conduce a la aparición de cepas que son resistentes a uno o varios grupos de fungicidas. La mayoría de los fungicidas registrados para su uso en el tomate son protectores en su acción y no suprimirán una infección establecida, lo que limita el control efectivo pre-cosecha de las aplicaciones de fungicidas.

Por lo tanto, había una necesidad sentida y no satisfecha de estrategias convenientes, eficientes y económicamente sostenibles para proteger las plantas de tomate contra la infestación por *Botrytis cinerea*.

50 En una primera realización, la invención se refiere a un marcador de ADN, que está enlazado al grupo de enlace 6 del locus de resistencia a *Botrytis cinerea* de la planta de tomate 04TEP990312, cuya semilla fue depositada bajo el Número de Depósito NCIMB 41623, y que puede amplificarse por un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR seleccionados de

- i. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,

- ii. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4.

Además, la presente invención se refiere al uso de algunos o todos los marcadores de ADN de la realización 1

- iii. para la selección diagnóstica de dicho locus de resistencia a *Botrytis cinerea* en una planta de tomate, o  
 5 iv. para identificar en una planta de tomate la presencia de dicho locus de resistencia a *Botrytis cinerea* y/o para vigilar la introgresión de dicho locus de resistencia a *Botrytis cinerea* en una planta de tomate, particularmente una planta de *Solanum lycopersicum*.

La presente descripción proporciona, además, una planta de tomate, en particular una planta de tomate cultivada, que es resistente a *Botrytis cinerea* y, por lo tanto, está protegida del daño provocado por este patógeno. La provisión de plantas de tomate resistentes a *Botrytis* es una alternativa ecológica para el uso de plaguicidas y puede aumentar la eficiencia de las opciones de control biológico y contribuir a programas exitosos de gestión integrada de plagas.

El problema técnico que subyace en la presente descripción es, por lo tanto, la provisión de una planta de *tomate* resistente a *Botrytis*, que muestra resistencia a este patógeno.

15 El problema técnico se resuelve. En particular, el problema técnico se resolvió al proporcionar una planta de tomate que exhibe resistencia a *Botrytis cinerea*, comprendiendo dicha planta al menos un determinante genético que dirige o controla la expresión de dicha resistencia a *Botrytis cinerea*, en la planta de tomate, en donde dicho determinante genético se puede obtener de un fuente de tomate silvestre, particularmente de *Solanum habrochaites*, particularmente de *Solanum habrochaites*, 04TEP990312, cuya semilla ha sido depositada bajo el Número de Depósito NCIMB 41623. Además, ahora se descubrió, sorprendentemente que el enlace entre genes responsables de cambios morfológicos no deseados en la planta y el gen responsable de la resistencia a *Botrytis cinerea* como está presente en el material fuente de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, en *Solanum habrochaites*, podría romperse y, por lo tanto, ya no está presente en la planta de tomate de acuerdo con la descripción.

25 (1) En un 1<sup>o</sup> aspecto, la descripción se refiere a una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, que exhibe resistencia a *Botrytis cinerea*, comprendiendo dicha planta al menos un determinante genético que dirige o controla la expresión de dicha resistencia a *Botrytis cinerea*, en la planta de tomate, en la que el o los determinantes genéticos mapea(n) al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b.

30 (2) En particular, en un aspecto específico, dicho determinante genético está representado por al menos un QTL o una parte funcional del mismo capaz de dirigir o controlar la expresión de dicha resistencia a *Botrytis cinerea*.

(3) En otro aspecto específico de la descripción, dicho QTL o una parte funcional del mismo mapea al menos a un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b.

35 (4) En un aspecto, se proporciona una planta de tomate de acuerdo con el aspecto (2), particularmente una planta de tomate cultivada, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo está genéticamente enlazado a al menos un locus marcador, que se co-segrega con el rasgo de resistencia a *Botrytis* y puede identificarse en una reacción PCR por al menos un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprenden

- i. un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, o  
 ii. un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, o  
 iii. un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6, o  
 40 iv. un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, o  
 v. un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10, o  
 vi. un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12, o

45 por cualquier marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, se co-segrega conjuntamente con el rasgo de resistencia a *Botrytis*.

(5) En un aspecto, se proporciona una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo está genéticamente enlazado a al menos dos loci marcadores que flanquean dicho QTL o un parte del mismo, loci marcadores flanqueantes que pueden identificarse en una reacción de PCR

- i. por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, y/o
- 5 ii. por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, y/o
- iii. por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12, y/o
- 10 por cualquier marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, está genéticamente enlazado al rasgo de resistencia a *Botrytis*.
- (6) En un aspecto de la descripción, se proporciona una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo se mapea al grupo de enlace 6 y está flanqueado por marcadores de ADN representados por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4.
- 15 (7) En un aspecto de la descripción, se proporciona una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo se mapea al grupo de enlace 1b y está flanqueado por marcadores de ADN representados por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8.
- 20 (8) En un aspecto de la descripción, se proporciona una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo se mapea al grupo de enlace 9b y está flanqueado por marcadores de ADN representados por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12.
- 25 (9) En un aspecto de la descripción, se proporciona una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo se mapea al grupo de enlace 9b y puede ser identificado en un PCR por una reacción por marcadores de ADN representados por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10.
- 30 (10) En un aspecto, la descripción se refiere a una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende al menos un alelo en un locus de rasgo cuantitativo en el genoma del tomate que contribuye a la resistencia a *Botrytis cinerea*, que está genéticamente enlazado a al menos un locus marcador, que se co-segrega con el rasgo de resistencia de a *Botrytis cinerea*, y puede identificarse en una reacción PCR por al menos un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprenden
- 35 i. un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, o
- ii. un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, o
- iii. un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6, o
- 45 iv. un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, o
- v. un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10, o
- vi. un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12, o
- por cualquier marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, se co-segrega conjuntamente con el rasgo de resistencia a *Botrytis*.
- 50 (11) En un aspecto, la descripción se refiere a una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende al menos un alelo en un locus de rasgo cuantitativo en el genoma del tomate que contribuye a la resistencia a *Botrytis cinerea*, que es complementario al

alelo correspondiente presente en la línea de *Solanum habrochaites*, 04TEP990312, cuya semilla está depositada bajo el Número de Depósito NCIMB 41623, o en la progenie o en un ancestro de la misma, y está genéticamente enlazado a al menos un locus marcador en el genoma de la línea de *Solanum habrochaites*, 04TEP990312, NCIMB 41623, o en la progenie o en un ancestro de la misma, cuyo locus marcador se co-segrega con el rasgo de resistencia a *Botrytis cinerea* y puede identificarse en el genoma de la línea de *Solanum habrochaites*, 04TEP990312, NCIMB 41623, o en la progenie o en un ancestro de la misma, en una reacción PCR por al menos un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprenden

- i. un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, o
- ii. un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, o
- iii. un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6, o
- iv. un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, o
- v. un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10, o
- vi. un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12, o

por cualquier marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, se co-segrega conjuntamente con el rasgo de resistencia a *Botrytis*.

(12) En un aspecto de la descripción, se proporciona una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo se mapea al grupo de enlace 6 y está flanqueado por marcadores de ADN representados por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, que comprende, además, un segundo QTL que contribuye a la resistencia a *Botrytis cinerea*, o una parte del mismo que confiere resistencia a *Botrytis cinerea*, en el que dicho segundo QTL (2) se mapea al grupo de enlace 1b y se define mediante marcadores de ADN flanqueantes representados por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8

(13) En un aspecto de la descripción, se proporciona una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo se mapea al grupo de enlace 6 y está flanqueado por marcadores de ADN representados por un 1<sup>o</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, que comprende, además, un segundo QTL que contribuye a la resistencia a *Botrytis cinerea*, o una parte del mismo que confiere resistencia a *Botrytis cinerea*, en el que dicho segundo QTL (2) se mapea al grupo de enlace 1b y se define mediante marcadores de ADN flanqueantes representados por un 1<sup>o</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, que comprende, además, un tercer QTL que contribuye a la resistencia a *Botrytis cinerea*, o una parte del mismo que confiere resistencia a *Botrytis cinerea*, en el que dicho tercer QTL (3) se mapea al grupo de enlace 9b y se define mediante marcadores de ADN representados por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10 y/o un marcador adyacente representado por un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12.

(14) En un aspecto de la descripción, se proporciona una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho al menos un QTL se puede obtener de una planta donante que tiene el fondo genético de *Solanum habrochaites* 04TEP990312, cuya semilla ha sido depositada bajo el Número de Depósito NCIMB 41623, o en la progenie o en un ancestro de la misma, que comprende dicho al menos un QTL o una parte de la misma que confiere resistencia a *Botrytis cinerea*.

(15) En un aspecto, se proporciona una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho determinante genético se puede obtener de *Solanum habrochaites* 04TEP990312, cuya semilla ha sido depositada bajo el Número de Depósito NCIMB 41623.

(16) En un aspecto de la descripción, la planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, es una planta de acuerdo con el aspecto (15), en donde dicha resistencia QTL proporciona una resistencia monogénica y dominante a *Botrytis cinerea*.

## ES 2 749 966 T3

(17) En un aspecto de la divulgación, la planta de tomate es una planta de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, cuya planta es una planta de tomate del género *Solanum lycopersicum*, particularmente (18) una planta de tomate cultivada, particularmente (19) a haploide, un di-haploide, un endogámico o un híbrido.

5 (20) En un aspecto, la descripción proporciona una planta de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, que es una planta de tomate híbrida, particularmente una planta de tomate cultivada, que comprende al menos un QTL o una parte del mismo que confiere resistencia a *Botrytis cinerea*, que está genéticamente enlazado a al menos un locus marcador co-segregante con el rasgo de resistencia a *Botrytis*, en el que dicho al menos un QTL se puede obtener de una planta donante que tiene el fondo genético de *Solanum habrochaites* 04TEP990312, cuya semilla ha sido depositada bajo el Número de Depósito NCIMB 41623, o en la progenie o en un ancestro de la misma, que  
10 comprende dicho al menos un QTL o una parte que confiere resistencia a *Botrytis cinerea* de la misma.

(21) En un aspecto, la planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de la descripción es una planta de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, que produce frutos seleccionados del grupo que consiste en tomates en rodajas o tomates de globo, tomates cherry, tomates de bistec y tomates ciruela.

15 (22) La presente descripción se refiere, además, a la semilla de una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, que es capaz de cultivar una planta de tomate resistente a *Botrytis cinerea* de acuerdo con la descripción.

(23) En otro aspecto, se proporciona en esta memoria un kit para la detección del locus de resistencia a *Botrytis cinerea* en una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, en donde dicho kit comprende al menos un cebador de oligonucleótidos de PCR, particularmente un cebador oligonucleotídico de PCR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12 o un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR, seleccionados de  
20

- a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,
- 25 b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,
- c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;
- 30 d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8;
- e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10; y
- f. par de cebadores 6 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12; u

35 otro cebador que representa un marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, se co-segrega conjuntamente con el rasgo de resistencia a *Botrytis*.

(24) En un aspecto, se proporciona un marcador de ADN que está enlazado al locus de resistencia a *Botrytis cinerea* en una planta de tomate, particularmente en una planta de tomate cultivada, y puede amplificarse por al menos un cebador de oligonucleótidos seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12, o mediante un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR, seleccionados de  
40

- a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,
- 45 b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,
- c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;
- 50 d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8;
- e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10; y

## ES 2 749 966 T3

- f. par de cebadores 6 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12; o

por otro cebador que representa un marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, se co-segrega conjuntamente con el rasgo de resistencia a *Botrytis*.

(25) En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere también al uso de algunos o todos estos marcadores de ADN de acuerdo con la descripción para la selección diagnóstica del locus de resistencia a *Botrytis cinerea* en una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, particularmente del locus de resistencia a *Botrytis cinerea* en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b, particularmente en una planta de tomate de acuerdo con la descripción.

(26) En otro aspecto, la presente descripción contempla además el uso de algunos o todos estos marcadores de ADN para identificar en una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, particularmente una planta de tomate de acuerdo con la descripción, la presencia del locus de resistencia a *Botrytis cinerea* y/o para controlar la introgresión del locus de resistencia a *Botrytis cinerea* en una planta de tomate, particularmente en una planta de tomate cultivada, particularmente una planta de *Solanum lycopersicum*, particularmente en una planta de tomate de acuerdo con la descripción y como se describe en esta memoria.

(27) En un aspecto, la descripción se refiere al polinucleótido (producto de amplificación) obtenible en una reacción PCR que implica al menos un cebador de oligonucleótidos seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12, o un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR, seleccionados de

- a. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,
- b. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4,
- c. par de cebadores 3 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6;
- d. par de cebadores 4 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8;
- e. par de cebadores 5 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10; y
- f. par de cebadores 6 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12; o

por otro cebador que representa un marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, se co-segrega con el rasgo de resistencia a *Botrytis*, cuyo producto de amplificación corresponde a un producto de amplificación obtenible de *Solanum habrochaites* 04TEP990312, cuya semilla ha sido depositada bajo el Número de Depósito NCIMB 41623, en una reacción de PCR con cebadores o pares de cebadores idénticos, siempre que el respectivo locus marcador esté todavía presente en dicha planta de tomate y/o se pueda considerar un alelo del mismo .

(28) En un aspecto específico, la descripción se refiere a un producto de amplificación de acuerdo con el aspecto (27) obtenido en una reacción PCR utilizando

- i. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 205 pb y 235 pb, particularmente entre 210 pb y 230 pb ; particularmente entre 215 pb y 225 pb y/o es entre 10% y 20%, particularmente entre 12% y 18%, en particular aproximadamente 14% más corto que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de élite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;
- ii. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 224 pb y 226 pb y/o es entre 0,4% y 1,8%, particularmente entre 0,8% y 1,5% más largo que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de élite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;
- iii. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 160 pb y 170 pb, particularmente entre 162 pb y 168 pb ; particularmente entre 164 pb y 166 pb y/o es entre 3% y 10%,

particularmente entre 5% y 9%, en particular aproximadamente 6% más corto que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de elite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;

5 iv. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 85 pb y 95 pb, particularmente entre 88 pb y 92 pb; y/o es entre 5% y 15%, particularmente entre 8% y 12%, en particular aproximadamente 11% más corto que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de elite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;

10 v. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 290 pb y 320 pb, particularmente entre 280 pb y 310 pb; y/o es entre 5% y 15%, particularmente entre 8% y 12%, en particular aproximadamente 10% más corto que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de elite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;

15 vi. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 140 pb y 160 pb, particularmente entre 145 pb y 155 pb; y/o es entre 10% y 30%, particularmente entre 15% y 25%, en particular aproximadamente 20% más corto que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de elite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;

20 (29) También se describe en esta memoria un polinucleótido que tiene al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de dicho producto de amplificación y/o un polinucleótido que exhibe una secuencia de nucleótidos que se hibrida con las secuencias de nucleótidos de dicho producto de amplificación obtenible en la reacción PCR anterior.

25 El producto de amplificación de acuerdo con la descripción y descrito anteriormente en esta memoria se puede utilizar para generar o desarrollar nuevos cebadores y/o sondas que se pueden utilizar para identificar el locus de resistencia a *Botrytis cinerea*.

30 (30) Por lo tanto, la presente descripción se refiere, además, en un aspecto a marcadores derivados, particularmente a cebadores o sondas derivados, desarrollados a partir de un producto de amplificación de acuerdo con la descripción y tal como se describe en esta memoria por métodos conocidos en la técnica, marcadores derivados que están genéticamente enlazados al locus de resistencia a *Botrytis cinerea*, particularmente al locus de resistencia a *Botrytis cinerea* en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, grupo de enlace 1b y grupo de enlace 9b.

(31) Estos marcadores derivados pueden utilizarse para identificar plantas resistentes a *Botrytis cinerea*, en donde los marcadores específicamente descritos en esta memoria se recombinan en relación con la resistencia y, por lo tanto, ya no están presentes en el genoma de la planta resistente.

35 (32) En un aspecto adicional, se proporciona un método dentro de la presente descripción para introducir al menos un alelo asociado con la resistencia a *Botrytis cinerea* en un locus de rasgo cuantitativo que contribuye a la resistencia a *Botrytis cinerea* en una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, que carece de dicho alelo que comprende: a) obtener una primera planta de tomate de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos precedentes; b) cruzar dicha primera planta de tomate con una segunda planta de tomate, en donde dicha segunda planta de tomate carece de dicho alelo; y c) identificar una planta resultante del cruce que exhibe una resistencia incrementada a *Botrytis cinerea* y que comprende al menos un alelo marcador co-segregado con dicha resistencia a *Botrytis cinerea*; y d), opcionalmente, aislar dicha planta y e) opcionalmente, realizar un retrocruzamiento de dicha planta con la primera o segunda planta de tomate.

45 (33) En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un método para producir una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, que exhibe resistencia a *Botrytis cinerea*, que comprende las etapas de:

50 a. seleccionar una planta del género *Solanum*, que exhibe resistencia a *Botrytis cinerea*, en donde dicha resistencia está asociada con al menos un QTL o una parte funcional del mismo capaz de dirigir o controlar la expresión de dicha resistencia a *Botrytis cinerea*, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo está genéticamente enlazado a al menos un locus marcador, que se co-segrega con el rasgo de resistencia a *Botrytis* y puede identificarse en una reacción PCR por al menos un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR, que comprenden

i. un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, o

ii. un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, o

55 iii. un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6, o

- iv. un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, o
- v. un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10; o
- vi. un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12, o

5 por cualquier marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, se co-segrega conjuntamente con el rasgo de resistencia a *Botrytis*.

- b. cruzar dicha planta de la etapa a), que exhibe resistencia a *Botrytis cinerea*, con una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, que es susceptible a *Botrytis cinerea* o exhibe un nivel intermedio de resistencia contra *Botrytis cinerea*, y
- 10 c. seleccionar la progenie de dicho cruce que exhibe resistencia a *Botrytis* y demuestra asociación con dicho al menos un locus marcador de la etapa a).

(34) En un aspecto, la descripción se refiere a un método para producir una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, que exhibe resistencia a *Botrytis cinerea*, que comprende las etapas de:

- 15 a. seleccionar una planta del género *Solanum*, que exhibe resistencia a *Botrytis cinerea*, en donde dicha resistencia está asociada con al menos un QTL o una parte funcional del mismo capaz de dirigir o controlar la expresión de dicha resistencia a *Botrytis cinerea*, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo está genéticamente enlazado a al menos dos loci marcadores, que flanquean dicho QTL o una parte funcional del mismo, cuyos loci marcadores flanqueantes pueden identificarse en
- 20 i. una reacción PCR con un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4 y/o
- ii. una reacción PCR con un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8 y/o
- 25 iii. una reacción PCR con un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12, o

30 por un marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, está genéticamente enlazado al rasgo de resistencia a *Botrytis*, y.

- b. cruzar dicha planta de la etapa a), que exhibe resistencia a *Botrytis cinerea*, con una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, que es susceptible a *Botrytis cinerea* o exhibe un nivel intermedio de resistencia contra *Botrytis cinerea*, y
- 35 c. seleccionar la progenie de dicho cruce que exhibe resistencia a *Botrytis* y demuestra asociación con dicho al menos dos loci marcadores de la etapa a).

(35) En un aspecto de la descripción, se proporciona se proporciona un método de acuerdo con el aspecto 33 para obtener una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, resistente a *Botrytis cinerea*, en donde la planta donante de la etapa (a) comprende un QTL que contribuye a la resistencia a *Botrytis cinerea*, en donde dicho QTL o una parte funcional del mismo se mapea al grupo de enlace 6 y está flanqueado por marcadores de ADN representados por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4. En particular, dicha planta de *Solanum* donante de la etapa (a) es *Solanum habrochaites* (36).

45 (37) En un aspecto, se proporciona un método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos precedentes para obtener una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, resistente a *Botrytis cinerea*, en donde la planta de *Solanum* donante de la etapa (a) es una planta de tomate de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes, (38) el método comprende la etapa adicional de retrocruzar la planta de tomate resistente a *Botrytis* obtenida en la etapa c) con la planta de tomate susceptible de la etapa b).

50 (39) En un aspecto, la determinación de la asociación entre la resistencia de *Botrytis* y el al menos un locus marcador o los al menos dos loci marcadores en la etapa c) del método de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes se logra llevando a cabo una reacción PCR con los cebadores identificados en la etapa a).

(40) En un aspecto adicional, la descripción proporciona un método para obtener frutos de tomate resistentes a *Botrytis cinerea*, que comprende las etapas de:

i. sembrar una semilla de una planta de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 a 22 u obtenida en un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes; y

5 ii. cultivar dicha planta para producir frutos y cosechar los frutos producidos por dicha planta.

(41) En aun otro aspecto, la descripción se refiere a un QTL que confiere resistencia a *Botrytis cinerea* o una parte del mismo que confiere resistencia a *Botrytis cinerea*, que se mapea al grupo de enlace 6 del acceso de planta NCIMB 41623, y está asociado con al menos un 1<sup>er</sup> marcador de ADN representada por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2 y/o al menos un 2<sup>o</sup> marcador de ADN representado por un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, en particular (42) dichos QTL o una parte funcional del mismo está flanqueado por dichos 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> marcador de ADN.

(43) En aun otro aspecto, la descripción se refiere a un QTL que confiere resistencia a *Botrytis cinerea* o una parte del mismo que confiere resistencia a *Botrytis cinerea*, que se mapea al grupo de enlace 1b del acceso de planta NCIMB 41623, y está asociado con al menos un 1<sup>er</sup> marcador de ADN representado por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6. y un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, en particular (41) dicho QTL o una parte funcional del mismo está flanqueado por dichos 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> marcador de ADN.

(44) En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un QTL que confiere resistencia a *Botrytis cinerea* o una parte del mismo que confiere resistencia a *Botrytis cinerea*, que se mapea al grupo de enlace 9b del acceso de planta NCIMB 41623, y está asociado con al menos un 1<sup>er</sup> marcador de ADN representado por un 1<sup>er</sup> par de cebadores de oligonucleótidos de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10 y/o un marcador adyacente representado por un 2<sup>o</sup> par de cebadores de PCR que comprende el cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12, en particular (45) dicho QTL o una parte funcional del mismo está flanqueado por dichos 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> marcador de ADN.

(46) La presente descripción también se refiere al uso de material de propagación resistente a *Botrytis cinerea* obtenible de una planta de tomate de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes para cultivar una planta resistente a *Botrytis* para producir frutos y cosechar dichos frutos.

(47) En aún otro aspecto, en la descripción se proporciona un método para proteger un cultivo de plantas de tomate, particularmente plantas de tomate cultivadas, contra la infección por *Botrytis cinerea*, en el que dicho método se caracteriza por plantar una semilla de acuerdo con el aspecto 22 y cultivar una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, que exhibe una resistencia contra *Botrytis cinerea*, en particular, (48) dicha planta o cultivo de tomate se rocía con un producto químico de protección de cultivos activo contra *Botrytis cinerea*, a una concentración menor o con menos frecuencia que un cultivo de tomate que no exhibe dicha resistencia.

(49) En un aspecto, la descripción se refiere a un método para producir semillas híbridas de una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, resistente a *Botrytis*, que comprende las etapas de:

i. plantar una planta o línea femenina con esterilidad masculina, y una planta o línea con fertilidad masculina, en donde al menos una de dichas plantas o líneas masculinas o femeninas es una planta de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 21,

ii. efectuar la polinización cruzada entre ambas líneas,

iii. cultivar la planta de la progenie hasta la fructificación,

iv. recoger los frutos y

v. obtener las semillas híbridas.

(50) En un aspecto específico, la descripción se refiere a un método para producir semillas híbridas de una planta de tomate, particularmente una planta de tomate cultivada, resistente a *Botrytis*, que comprende las etapas de:

i. plantar una planta o línea femenina con esterilidad masculina, y una planta o línea con fertilidad masculina, en donde al menos una de dichas plantas o líneas masculinas o femeninas es una planta de acuerdo con cualquiera de los aspectos precedentes,

ii. efectuar la polinización cruzada entre ambas líneas,

iii. seleccionar una progenie de dicho cruce que exhibe resistencia a Botrytis y demuestra asociación con dicho al menos un locus marcador de la etapa a), utilizando al menos uno de los marcadores descritos en esta memoria,

iv. cultivar la planta de la progenie seleccionada en iii) hasta la fructificación,

5 v. recoger los frutos y

vi. obtener las semillas híbridas.

### **Definiciones**

10 Los términos y las expresiones técnicas utilizados se han de dar generalmente para el significado comúnmente aplicado a ellos en la técnica pertinente de la reproducción y el cultivo de plantas, si no se indica lo contrario en esta memoria a continuación.

15 Como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el", "la" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, 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. Así, 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.

20 Una planta "cultivada de tomate" 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 el uso y/o fines de crecimiento y/o consumo humano. Se entiende además que "plantas de tomate cultivadas" excluye aquellas especies de tipo silvestre que comprenden el rasgo que es objeto de esta invención como un rasgo natural y/o parte de su genética natural.

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

30 Un "alelo" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse 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 alternativos en herencia porque están situados en el mismo lugar 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.

35 Un alelo asociado con un rasgo cualitativo puede comprender formas alternativas o variantes de diversas unidades genéticas incluyendo aquellas que son idénticas o están asociadas con un único gen o múltiples genes o sus productos o incluso un gen que perturba o es controlado por un factor genético que contribuye en el fenotipo representado por el locus.

40 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "alelo marcador" se refiere a una forma alternativa o variante de una unidad genética como se define anteriormente en esta memoria, cuando se utiliza como un marcador para localizar loci genéticos que contiene alelos en un cromosoma que contribuyen a la variabilidad de los rasgos fenotípicos.

45 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "reproducción", y variantes gramaticales del mismo, se refieren a cualquier proceso que genera un individuo de la progenie. 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. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "población reproductora establecida" se refiere a una colección de potenciales participantes reproductores producidos por y/o utilizados como parentales en un programa de reproducción; por ejemplo, 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 50 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.

- 5 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "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.
- Se entiende que "homocigoto" dentro del alcance de la invención se refiere a alelos similares en uno o más loci correspondientes en cromosomas homólogos.
- Se entiende que "heterocigoto" dentro del alcance de la invención se refiere a alelos diferentes en uno o más loci correspondientes en cromosomas homólogos.
- 10 "Retrocruzamiento" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a un proceso en el que una progenie híbrida se cruza repetidamente de nuevo a uno de los parentales. Se pueden utilizar diferentes parentales recurrentes en retrocruzamientos posteriores.
- "Locus" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a una región en un cromosoma, que comprende un gen o cualquier otro elemento genético o factor que contribuye a un rasgo.
- 15 Tal como se utiliza 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 está asociado con uno o más loci de interés, que puede comprender un gen o cualquier otro elemento genético o factor que contribuya a un rasgo. "Locus marcador" también se refiere a una región en un cromosoma, que comprende una secuencia de polinucleótidos complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico utilizado como sondas.
- 20 "Ligamiento genético" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a una asociación de caracteres de herencia debido a la ubicación de los genes en la proximidad en el mismo cromosoma, medidos por ciento de recombinación entre loci (centi-Morgan, CM).
- 25 Para el propósito 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 ser transmitidos juntos porque están físicamente juntos en el mismo cromosoma (recombinación reducida entre ellos debido a su proximidad física), dando como resultado 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 genético y que no puede explicarse fácilmente por casualidad.
- 30 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "arquitectura genética en el locus de rasgos cuantitativos" se refiere a una región genómica que está estadísticamente correlacionada con el rasgo fenotípico de interés y representa la base genética subyacente del rasgo fenotípico de interés.
- 35 Tal como se utiliza en esta memoria, las expresiones "cruzados sexualmente" y "reproducción sexual" en el contexto de la presente materia objeto descrita se refiere a la fusión de los gametos para producir progenie (*p. ej.*, por fertilización, tal como para producir semillas por polinización en plantas). Un "cruce sexual" o "fertilización cruzada" es en algunas realizaciones la fertilización de un individuo por otro (*p. ej.*, polinización cruzada en plantas). El término "auto-fecundación" se refiere en algunas realizaciones a la producción de semilla por auto-fecundación o auto-polinización; es *decir*, el polen y el óvulo son de la misma planta.
- 40 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "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), indeles (*es decir*, inserciones/delecciones), repeticiones de secuencia simple (SSR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD), marcadores de secuencias polimórficas amplificadas escindidas (CAPS), marcadores de Tecnología de Matrices de Diversidad (DArT) y polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (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 "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.
- 45
- 50 Un marcador genético puede estar ubicado físicamente en una posición en un cromosoma que está 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 no se ha identificado la ubicación en un 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 y hay una tasa de recombinación distinta de cero 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
- 55

un gen tal como, pero no limitado a un polimorfismo dentro de un intrón o un exón de un gen). En 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.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "genotipo" se refiere a la constitución genética de una célula u organismo. El "genotipo de un individuo para un conjunto de marcadores genéticos" incluye los alelos específicos, para uno o más loci de marcadores genéticos, presentes en el haplotipo del 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  
10 más genes que están relacionados porque uno o más de los genes están implicados en la expresión de un fenotipo de interés (*p. ej.*, un rasgo cuantitativo tal como se define en esta memoria). Por tanto, en algunas realizaciones, un genotipo comprende un sumario de uno o más 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).

15 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "germoplasma" se refiere a la totalidad de los genotipos de una población o de 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 depósito de diversos alelos. La expresión "germoplasma adaptado" se refiere a materiales vegetales de probada superioridad genética; *p. ej.*, para un entorno o área geográfica dado, mientras que las expresiones "germoplasma no adaptado", "germoplasma bruto" y  
20 "germoplasma exótico" se refieren a materiales vegetales de valor genético desconocido o no probado; *p. ej.*, para un entorno o área geográfica dado; como tal, la expresión "germoplasma no adaptado" se refiere en algunas realizaciones a materiales vegetales que no son parte de una población reproductora establecida y que no tienen una relación conocida con un miembro de la población reproductora establecida.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "híbrido" y las expresiones "planta híbrida" y "progenie híbrida" se refieren a un individuo genéticamente producido a partir de diferentes parentales (*p. e.*, un individuo genéticamente heterocigoto o mayormente heterocigoto).

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "híbrido F<sub>1</sub> simple" se refiere a un híbrido F<sub>1</sub> producido a partir de un cruce entre dos líneas endogámicas.

30 Tal como se utiliza 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 líneas endogámicas reproducen verdaderamente uno o más rasgos fenotípicos de interés. Un "endogámico", "individuo endogámico" o "descendencia endogámica" es un individuo muestreado de una línea endogámica.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "línea dihaploide", se refiere a líneas endogámicas estables emitidas desde el cultivo de anteras. 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).

40 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "enlace" y variantes gramaticales del mismo, se refiere a la tendencia de los alelos en diferentes loci en el mismo cromosoma a segregarse juntos más a menudo de lo esperado por casualidad si su transmisión fuera independiente, en algunas realizaciones como consecuencia de su proximidad física.

45 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "grupo de enlace" se refiere a un conjunto de genes, alelos o loci que tienden a ser transmitidas y a segregarse juntos y habitualmente pertenecen a un cromosoma dado. En la mayoría de los casos, un grupo de enlace X dado corresponde al cromosoma X. Por consiguiente, dentro del alcance de la presente invención, el grupo de enlace 6 corresponde al cromosoma 6, los grupos de enlace 1a y 1b corresponden al cromosoma 1 y el grupo de enlace 9b corresponde al cromosoma 9.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "ácido nucleico" se refiere a cualquier cadena física de unidades monoméricas que se pueden corresponder con una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (*p. e.*, un ADN típico, ADNc o un polímero de ARN), oligonucleótidos modificados (*p. e.*, oligonucleótidos que comprenden bases que no son típicas de ARN o ADN biológicos, 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  
55 cualquier secuencia explícitamente indicada.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "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.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "resistencia" se refiere a la capacidad de una planta de restringir el crecimiento y desarrollo de un patógeno especificado y/o el daño que provoca cuando se compara con plantas susceptibles en condiciones ambientales y presión patógena similares. Las plantas resistentes pueden presentar algunos síntomas de la enfermedad o daños bajo la presión del patógeno, p. ej., hongos.

- 5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "susceptibilidad" se refiere a la incapacidad de una planta de restringir adecuadamente el crecimiento y el desarrollo de un patógeno especificado.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "resistencia a *Botrytis*" o "resistencia a *Botrytis cinerea*" o "planta resistente a *Botrytis*" se refiere a la capacidad de las plantas de resistir la colonización por el hongo.

- 10 La resistencia a *Botrytis* se determina dentro del alcance de la presente invención en un test patológico, tal como se describe en detalle en el Ejemplo 1.1 que figura más adelante.

- 15 El test patológico está diseñado de tal manera que la resistencia evidenciada resultante es lo más cercana posible a las condiciones comerciales de la vida real de cultivo de tomate. En particular, la resistencia se manifiesta por sí misma en el tallo de la planta, en donde se podó la hoja y el corte se deja inoculado con *Botrytis mycelium*. Esta evaluación de resistencia imita las condiciones de infestación de la planta de tomate en los invernaderos por el patógeno *Botrytis*, en donde los productores cortan y eliminan continuamente las hojas laterales para facilitar la tutoría y la recolección, así como para equilibrar el vigor y la productividad de la planta.

- 20 Además, el ensayo de resistencia de acuerdo con la presente invención se realiza con un cierto número de cepas agresivas y muy agresivas de *Botrytis*, que han sido desarrolladas a partir de una colección de diferentes aislados de cepas (véase la tabla 2). Los aislados se han caracterizado en base a la morfología y las secuencias ITS de ADN ribosómico (ADNr).

- 25 Una planta está calificada como un "una planta resistente a *Botrytis*" si una colección núcleo de cepas tal como la mostrada en la Tabla 2, que es virulenta a una línea de élite de *S. lycopersicum* en un test patológico de acuerdo con el Ejemplo 1, que muestra diferentes niveles de agresividad evidenciados por lesiones del tallo de diversas longitudes, particularmente lesiones del tallo de entre 15 mm y 50 mm de longitud, no pudieron desarrollar lesiones del tallo en la planta de ensayo de ninguna importancia, es decir, lesiones del tallo de menos de 6 mm, particularmente de menos de 5 mm de longitud.

- 30 Tal como se utiliza 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.

- 35 [Tal como se utiliza en esta memoria, el término "progenie" se refiere al o a los descendientes de un cruce particular. Típicamente, la progenie es el resultado de la reproducción de dos individuos, aunque algunas especies (particularmente algunas plantas y animales hermafroditas) pueden ser auto-fecundadas (es decir, la misma planta actúa como donante tanto de gametos masculinos como femeninos). El o los descendientes pueden ser, por ejemplo, de la F<sub>1</sub>, la F<sub>2</sub>, o cualquier generación posterior.

- 40 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "rasgo cuantitativo" se refiere a un rasgo fenotípico que puede describirse numéricamente (es decir, cuantificado o cuantificarse). Un rasgo cuantitativo típicamente exhibe variación continua entre los individuos de una población; es decir, las diferencias en el valor numérico del rasgo fenotípico son leves y se clasifican entre sí. Con frecuencia, la distribución de frecuencia en una población de un rasgo fenotípico cuantitativo exhibe una curva en forma de campana (es decir, exhibe una distribución normal entre dos extremos). En el presente caso, el rasgo cuantitativo exhibe una variación continua entre individuos de una población en términos de resistencia a un hongo del género *Botrytis*, particularmente *Botrytis cinerea*, cuya resistencia se puntúa mediante un Ensayo de Resistencia estandarizado utilizando la longitud de las lesiones necróticas alrededor del sitio de infestación para evaluar la gravedad de la infestación.

- 45 Un rasgo cuantitativo (QTL) es típicamente el resultado de un locus genético que interactúa con el entorno o de múltiples loci genéticos que interactúan entre sí y / o con el entorno. Ejemplos de rasgos cuantitativos incluyen la altura y el rendimiento de la planta.

- 50 Para el propósito 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 ser transmitido juntos porque están físicamente cerca juntos en el mismo cromosoma (recombinación reducida entre ellos debido a su proximidad física), dando como resultado una asociación no aleatoria de sus alelos como resultado de su proximidad en el mismo cromosoma. "co-segregación" también se refiere a la presencia de dos o más rasgos dentro de una sola planta de los cuales se sabe que al menos uno es genético y que no puede explicarse fácilmente por casualidad.

- 55 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "rasgos cuantitativos locus" (QTL) y "asociación de rasgo marcador" se refiere a una asociación entre un marcador genético y una región cromosómica y/o el gen que afecta el fenotipo de un rasgo de interés. Típicamente, esto se determina estadísticamente; p. e.,, basado en uno o más

métodos publicados en la bibliografía. Un QTL puede ser una región cromosómica y/o un locus genético con al menos dos alelos que afectan diferencialmente un rasgo fenotípico (ya sea un rasgo cuantitativo o cualitativo).

5 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "rasgo cualitativo" se refiere a un rasgo fenotípico que está controlado por uno o unos pocos genes que exhiben importantes efectos fenotípicos. Debido a esto, los rasgos cualitativos son típicamente heredados simplemente. Ejemplos en plantas incluyen, pero no se limitan al color de la flor, al color del fruto y varias resistencias a enfermedades conocidas, tales como, por ejemplo, resistencia a manchas de hongos, resistencia al marchitamiento por *Fusarium* o resistencia al virus del mosaico del tomate.

10 "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 utilizarse (o evitarse) en un programa de reproducción selectiva.

15 "marcador de microsatélites 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 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 de producir cantidades relativamente grandes de regiones específicas de ADN o subconjunto(s) del genoma, de ese modo haciendo posible diversos análisis que se basan en esas regiones.

20 "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.

"Fenotipo" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a una o más característica(s) distinguible(s) de un rasgo controlado genéticamente.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "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.

25 "Polimorfismo" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a la presencia en una población de dos o más formas diferentes de un gen, marcador genético o rasgo heredado o un producto génico que se puede obtener, por ejemplo, a través de corte y empalme alternativo, metilación de ADN, etc.

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

30 Planta "de prueba" se entiende dentro del alcance de la invención para referirse a una planta del género *Solanum* utilizada para caracterizar genéticamente un rasgo en una planta para ser sometida a ensayo. 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.

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

40 El término "hibridar", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente a condiciones de hibridación en las que se utiliza 5xSSPE, SDS al 1%, solución de 1xDenhardt se utiliza como una solución y/o temperaturas de hibridación son entre 35°C y 70°C, preferiblemente 65°C. Después de la hibridación, el lavado se realiza preferiblemente primero con 2xSSC, SDS al 1% y posteriormente 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 Denhardts, 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.

45 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.

50 "Homología de secuencia o identidad de secuencia" se utiliza en esta memoria de manera indistinta. 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. Como se utiliza en esta memoria, el porcentaje de

55

identidad/homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = nº de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada uno de los huecos, que deben introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático, tal como se describe más adelante en esta memoria. Por ejemplo, la identidad de secuencia se puede determinar convencionalmente con el uso de programas informáticos como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, 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 hibridan entre sí en condiciones rigurosas. La expresión: "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.

"Condiciones de hibridación rigurosas" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de experimentos de hibridación de ácido nucleico, tales como las hibridaciones Southern y Northern dependen de la secuencia, y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. 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. Generalmente, 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. Típicamente, en "condiciones rigurosas" hibridará una sonda con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias.

El punto de fusión térmico es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Se seleccionan condiciones muy rigurosas para que sean iguales a la temperatura de fusión ( $T_{sub}$ ) 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 0,2 veces SSC a 65°C durante 15 minutos (véase, Sambrook, *infra*, para una descripción del 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.

5 "Cultivo de células vegetales" significa cultivos de unidades vegetales, tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo celular, células en tejidos vegetales, polen, tubos polínicos óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diversas etapas de desarrollo.

"Material vegetal" o "material vegetal obtenible de una planta" se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, cultivos de células o tejidos, o cualquier otra parte o producto de una planta.

10 Un "órgano de la planta" es una parte distinta y visiblemente estructurada y diferenciada de una planta, tales como una raíz, tallo, hoja, brote de flor o embrión.

15 "Tejido vegetal", tal se utiliza en esta memoria, significa 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 la subespecie, taxonómicamente subordinados a una especie y de orden superior a un sub-raza y marcados por un perfil predeterminado de factores latentes de los rasgos hereditarios.

20 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "población" significa una colección genéticamente heterogénea de plantas que comparten una derivación genética común.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "tomate" significa cualquier variedad, cultivar o población de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum cheesmaniae*, *Solanum neorickii*, *Solanum chmielewskii*, *Solanum habrochaites*, *Solanum pennellii*, *Solanum peruvianum*, *Solanum chilense*, *S. lycopersicoides*, *S. N peruvianum*, *S. corneliomuelleri*, *S. 'Callejon de Huaylas'*, *S. galapagense a.d S. sitiens*. y *Solanum lycopersicum*.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "variedad" o "cultivar" significa un grupo de plantas similares que por las características estructurales y de rendimiento pueden ser identificadas de otras variedades dentro de la misma especie.

30 En un aspecto, la presente descripción se refiere a nuevas plantas de tomate y líneas de tomate resistentes a *Botrytis* y a métodos mejorados para la producción de las mismas utilizando los marcadores moleculares descritos en esta memoria en técnicas de reproducción selectiva. Más específicamente, la presente descripción proporciona determinadas nuevas plantas de tomate resistentes a *Botrytis*, en las que dicha resistencia está controlada por al menos un QTL. Las plantas de tomate que no contienen al menos uno de los QTL identificados aquí son susceptibles a la infección por *Botrytis*.

35 En particular, el al menos un QTL que controla la resistencia a *Botrytis* está localizado en los cromosomas 1, 6 y 9, respectivamente.

40 La descripción se refiere, en un aspecto, a una planta de tomate que exhibe resistencia a *Botrytis cinerea*, comprendiendo dicha planta al menos un determinante genético no nativo que dirige o controla la expresión de dicha resistencia a *Botrytis cinerea*, en la planta de tomate, en la que dicho o dichos determinante(s) genético(s) no nativo(s) se origina(n) a partir de una especie de tomate silvestre o un progenitor de la misma y mapea(n) a al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b.

45 Los marcadores moleculares situados en dichos cromosomas y que co-segregan con la resistencia a *Botrytis* pueden ser identificados utilizando la selección asistida por marcadores, técnicas para los que se conocen bien la técnica. Marcadores que pueden utilizarse en estas técnicas de selección están representados por al menos un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo de cebadores dados en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12, por cualquier marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, grupo de enlace 1b y grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, se co-segrega con el rasgo de resistencia a *Botrytis*. Una fuente de una planta de tomate resistente a *Botrytis* que contiene los QTL descritos anteriormente en esta memoria en los cromosomas 1, 6 y 9, respectivamente, es la línea de *Solanum habrochaites*, 04TEP990312, NCIMB 41623, cuya semilla ha sido depositada bajo el Número de Depósito NCIMB 41623. Otras plantas de tomate relacionadas que exhiben resistencia a *Botrytis* y que contienen uno o más QTLs que codifican la resistencia a *Botrytis* se pueden identificar ahora utilizando uno o más de los marcadores proporcionados en esta memoria.

55

Por otra parte, otros accesos de especies de tomate relacionados se pueden ahora examinar en cuanto a la presencia de al menos uno de los QTLs identificados en esta memoria mediante el uso de los marcadores de la presente invención, incluyendo, sin limitarse a, *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum cheesmaniae*, *Solanum neorickii*, *Solanum chmielewskii*, *Solanum habrochaites*, *Solanum pennellii*, *Solanum peruvianum*, *Solanum chilense*, *S. lycopersicoides*, *S. N peruvianum*, *S. corneliomuelleri*, *S. 'Callejon de Huaylas'*, *S. galapagense* a.d *S. sitiens*. y *Solanum lycopersicum*.

Los marcadores moleculares proporcionados en esta memoria y que co-segregan con al menos un QTL situado en los cromosomas 1, 6 y 9, respectivamente, contribuyendo a la resistencia a *Botrytis*, se pueden utilizar para introgresar uno o más de dichos QTL o una parte funcional de los mismos a partir de una primera planta donante en una segunda planta receptora.

La planta receptora es preferiblemente una planta de tomate, en particular una planta de tomate cultivada, en particular una *Solanum lycopersicum*, cultivada que lleva uno o más rasgos de importancia agronómica, tales como, por ejemplo,

a. capacidad de retención del fruto en la planta, es decir, paredes del fruto firmes y piel gruesa, sin descomposición de los frutos más viejos, sin germinación de semillas en los frutos más viejos, sin descomposición de azúcares dentro de los frutos más viejos y sin fermentación dentro de los frutos más viejos;

b. firmeza de los frutos para resistir la recolección mecánica y el transporte, así como el almacenamiento a cielo abierto a 38°C sin una descomposición significativa y desarrollo de enfermedades;

c. firmeza de los frutos para soportar vapor a alta presión (p. ej., 15-30 psi a 105° -120°C) y/o aplicación de productos químicos (p. ej., NaOH al 11-19% a 85°-99°C) para pelar la piel de los frutos;

d. firmeza de los frutos para resistir el vapor a alta presión para cocinar como tomates enteros;

e. firmeza de los frutos para resistir el corte para hacer productos de tomate en cubitos; y

f. firmeza de los productos de tomate en rodajas y en cubitos para resistir la cocción con vapor a alta presión.

Las plantas de tomate desarrolladas de acuerdo con la presente invención pueden derivar ventajosamente la mayoría de sus rasgos de la planta receptora, y derivar la resistencia a *Botrytis* de la primera planta donante. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los genes que codifican la resistencia a *Botrytis* se mapean identificando marcadores moleculares enlazados a loci de rasgos cuantitativos de resistencia, utilizando el mapeo una mezcla de plantas de tomate endogámicas resistentes y susceptibles a *Botrytis* 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). Por ejemplo, y sin limitación, la asociación entre el fenotipo resistente a *Botrytis* y el genotipo marcador puede investigarse utilizando el paquete de software QTL Cartographer (CJ Basten, P Gaffney, ZB Zeng, North Carolina State University, 2006).

En otro aspecto de la presente descripción, la presente descripción se refiere a métodos para producir nuevas plantas de tomate resistentes a *Botrytis* superiores. En el método de la presente descripción, uno o más genes que codifican la resistencia a *Botrytis* se introgresan de una planta parental donante que es resistente a *Botrytis* en una planta de tomate receptora que no es resistente o una planta que tiene niveles intermedios de resistencia a la infección por *Botrytis*. Las plantas de tomate resistentes a *Botrytis* producidas de acuerdo con los métodos de la presente descripción pueden ser plantas de tomate endogámicas, híbridas o haploides.

La introgresión de uno o más genes que codifican la resistencia a *Botrytis* en una planta de tomate receptora que no es resistente o posee niveles intermedios de resistencia a *Botrytis* se puede lograr utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, uno o más genes que codifican la resistencia a *Botrytis* pueden introgresarse en una planta de tomate receptora que no es resistente o en una planta que tiene niveles intermedios de resistencia a *Botrytis* utilizando técnicas de mejora tradicionales.

Las plantas de tomate de acuerdo con la presente descripción y tal como se describe en esta memoria se pueden utilizar en la producción de semillas de tomate comercial. Los tomates comerciales son generalmente híbridos producidos a partir del cruce de dos líneas parentales (endogámicas). El desarrollo de híbridos requiere, en general, el desarrollo de líneas endogámicas homocigóticas, el cruce de estas líneas y la evaluación de las cruces.

Los métodos de mejora genética de pedigrí y selección recurrente se utilizan para desarrollar líneas endogámicas a partir de poblaciones reproductoras. Los programas de reproducción combinan los antecedentes genéticos de dos o más líneas endogámicas o diversas otras fuentes de germoplasma en grupos de reproducción a partir de los cuales se desarrollan nuevas líneas endogámicas mediante autofecundación y selección de los fenotipos y características deseados. Las nuevas líneas endogámicas 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 falta 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 tomate se pueden polinizar fácilmente. Un rasgo también se transfiere fácilmente de una planta de tomate a otra planta, incluidas las plantas de tomate de diferentes tipos utilizando técnicas de mejora convencionales, por ejemplo, para obtener adicionalmente líneas comerciales. La introgresión 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 donante endogámico (el parental no recurrente) que porta el rasgo, particularmente el rasgo de "resistencia a *Botrytis*" 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, preferiblemente cuatro, más preferiblemente cinco o más generaciones de retrocruces con el parental recurrente con selección para el rasgo, particularmente el rasgo de "resistencia a *Botrytis*" 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 demás genes (véase, por ejemplo, Poehlman & Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4ª Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360-376, incorporado en esta memoria como referencia). La selección del rasgo se realiza después de cada uno de los cruces. La esterilidad masculina está disponible en tomates. En particular, la esterilidad masculina genética puede utilizarse en líneas comerciales. p. ej., líneas de tomate dulce (véase, por ejemplo, Alexander Kilchevsky y Michail Dobrodkin, *Acta Physiologiae Plantarum Volumen 22, Número 3 / septiembre de 2000*).

La población puede ser rastreada en un cierto número 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 son conocidos en la técnica. Específicamente, las plantas individuales o partes de las mismas se pueden enfrentar a *Botrytis* en una cámara climática o en un invernadero y se puntúan los fenotipos resistentes o susceptibles resultantes de cada una de las plantas puntuadas.

A modo de ejemplo, y no de limitación, las plantas se pueden rastrear en una cámara climática a una temperatura diurna de entre 20°C y 24°, particularmente a 22°C con una luminosidad de entre 4000 y 6000 lux, en particular 5000 lux y una temperatura nocturna de entre 16°C y 20°C, particularmente 18°C.

La evaluación de los síntomas se evalúa basándose en la longitud de la necrosis del tallo, que generalmente se desarrolla aproximadamente 2 a 4 días, en particular 3 días después de la inoculación. La evaluación de la necrosis se lleva a cabo aproximadamente 6 a 8 días, particularmente 7 días después de la inoculación. Para cada una de las líneas se registra una media de necrosis de longitud de cada una de las plantas de cada uno de los experimentos.

En particular, para la evaluación de las líneas e híbridos, las plantas se pueden rastrear en condiciones semi-artificiales cerca de las instalaciones de producción de mercado en condiciones de invernadero. Las semillas se siembran en bandejas con un sustrato adecuado, por ejemplo, compost adaptado, para la siembra. Las bandejas se incuban en cámaras climáticas con un fotoperíodo de 15 h/9 h (día/noche). La temperatura diurna está entre 22°C y 26°, particularmente 24°C con una luminosidad de entre 8000 y 12000 lux, particularmente 10000 lux, y una temperatura nocturna de entre 16°C y 20°C, particularmente 18°C.

Las plántulas se trasplantan en macetas con sustrato adecuado, por ejemplo compost adaptado, aproximadamente 8 a 12 días, particularmente 10 días después de la siembra. Después de 3 a 5 semanas, particularmente después de 4 semanas, las plántulas se trasplantaron directamente en el suelo en un invernadero.

La inoculación de las esporas puede llevarse a cabo después de aproximadamente 1,5 a 3 meses, en particular de 2 meses de crecimiento. Se podan de 2 a 3 hojas de cada una de las plantas. Se puede utilizar como inóculo una solución de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  esporas/ml de agua, particularmente una solución de  $1 \times 10^6$  esporas/ml de agua, que comprende opcionalmente 10% de sacarosa (peso/volumen). El inóculo se extiende inmediatamente después de la poda, en la parte herida. Se realiza una segunda inoculación seguida de una tercera inoculación cada 2 a 4 semanas, particularmente cada 3 semanas con el mismo protocolo. Después de varias semanas, en la referencia susceptible (la línea de élite de *Solanum lycopersicum*) se puede observar necrosis que resultó en la muerte de la

planta. La evaluación de los síntomas puede realizarse contando el número de plantas muertas por parcela y midiendo la longitud de necrosis más grande de cada una de las plantas de cada una de las parcelas una vez que al menos el 50% de las plantas susceptibles habían muerto. Para cada línea o híbrido, se registra una media de longitud de la necrosis.

- 5 En segundo lugar, la selección asistida por marcadores se puede realizar utilizando uno o más de los marcadores moleculares descritos anteriormente en esta memoria para identificar aquellas plantas híbridas que contienen uno o más de los genes que codifican la resistencia a *Botrytis*. 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 *Botrytis* contienen los genes necesarios que codifican la resistencia a *Botrytis*, y poseen características comercialmente deseables, luego se seleccionan y se autofecundan durante varias generaciones para permitir que la planta de tomate se vuelva cada vez más endogámica. Este proceso de autofecundación y selección continua se puede realizar durante cinco o más generaciones. El resultado de esta mejora y selección es la producción de líneas que son genéticamente homogéneas para los genes asociados con la resistencia a *Botrytis*, así como otros genes asociados con rasgos de interés comercial. Alternativamente, se puede desarrollar una nueva y superior línea de plantas de tomate endogámica resistente a *Botrytis* utilizando las técnicas de selección recurrente y retrocruzamiento. En este método, la resistencia a *Botrytis* puede ser introgresada en una planta receptora diana (que se denomina el parental recurrente) cruzando el parental recurrente con una primera planta donante (que es diferente del parental recurrente y a la que se alude en esta memoria como el "parental no recurrente"). El parental recurrente es una planta que no es resistente o que tiene un nivel intermedio de resistencia a *Botrytis* y posee características comercialmente deseables, tales como, pero no limitadas a resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas del fruto, etc.

- El parental no recurrente exhibe resistencia a *Botrytis* y contiene uno o más genes que codifican la resistencia a *Botrytis*. El parental no recurrente puede ser cualquier variedad de planta o línea endógama que tiene 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 previamente en esta memoria. En segundo lugar, la selección asistida por marcadores se puede realizar utilizando uno o más de 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 *Botrytis*. 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 proceso de retrocruzamiento hacia el parental recurrente y la selección de resistencia a *Botrytis* se repite durante aproximadamente cinco o más generaciones. La progenie resultante de este proceso es heterocigótica para uno o más genes que codifican la resistencia a *Botrytis*. La última generación de retrocruzamiento se autofecunda después con el fin de proporcionar una progenie de reproducción pura homocigótica para la resistencia a *Botrytis*. Las líneas de tomate endogámicas resistentes a *Botrytis* descritas en esta memoria pueden utilizarse en cruces adicionales para crear plantas híbridas resistentes a *Botrytis*. Por ejemplo, una primera planta de tomate endogámica resistente a *Botrytis* se puede cruzar con una segunda planta de tomate endogámica que posee rasgos comercialmente deseables, tales como, pero no limitados a resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características deseables de fruta, etc. Esta segunda línea de tomate endogámico puede o puede no ser resistente a *Botrytis*. La selección asistida por marcadores utilizada en los métodos descritos anteriormente en esta memoria puede realizarse, por ejemplo, por etapas, con lo cual los diferentes genes resistentes a *Botrytis* se seleccionan en más de una generación; o, como un ejemplo alternativo, simultáneamente, con lo cual todos los genes de resistencia se seleccionan en la misma generación. La selección asistida por marcadores para la resistencia a *Botrytis* se puede hacer antes, junto con, o después del ensayo y la selección de otros rasgos comercialmente deseables, tales como resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características deseables del fruto, etc.

En particular, la selección basada en marcadores se puede aplicar en combinación con o seguida de una selección del fenotipo para identificar aquellos individuos en los que todos los loci relevantes de la invención descritos en esta memoria tienen genotipos homocigotos favorables.

- 50 Existen varios tipos de marcadores moleculares que pueden utilizarse 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 amplificado (AFLP), repeticiones de secuencia única (SSR) y SNPs de polimorfismos de un solo nucleótido.

- 55 RFLP implica el uso de enzimas de restricción para cortar 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.

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

AFLP requiere la digestión del ADN celular con una o más enzimas de restricción antes de utilizar PCR y 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.

5 El análisis de SSR se basa en secuencias de microsatélites de ADN (repetición corta) que están ampliamente dispersas por todo el genoma de eucariotas, que se amplifican selectivamente 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.

10 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.

15 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.

20 La LCR puede realizarse con oligonucleótidos que tienen las secuencias proximales y distales 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 modo que no incluyan el sitio polimórfico (véase, Segev, Solicitud PCT WO 90/01069).

25 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.

30 Todavía otro método que se puede emplear alternativamente es el "Ensayo Invasor" que utiliza una endonucleasa flap específica para la estructura (FEN) para escindir un complejo tridimensional formada por la hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo se solapan con el ADN diana que contiene un único sitio de polimorfismo de nucleótidos (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.

35 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.

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 así el di-oligonucleótido (Wu et al., Genomics 4: 560 569 (1989)), y puede adaptarse fácilmente a los propósitos de la presente invención.

55 En una realización, un marcador molecular es un fragmento de ADN amplificado por PCR, p. ej., un marcador SSR o un marcador RAPD. 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 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.

5 En una realización específica de la invención, los marcadores de repetición de secuencia simple (SSR) se utilizan para identificar alelos relevantes para la invención en las plantas progenitoras y/o sus ancestros, así como en las plantas de la 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.

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

En la presente descripción, se puede utilizar un marcador o un conjunto de dos o más marcadores que comprenden un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR, que comprenden

- 15 i. un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, o  
 ii. un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, o  
 iii. un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6, o  
 iv. un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, o  
 v. un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10, o  
 20 vi. un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12,

cebadores que conducen a un producto de amplificación en una reacción PCR que exhibe un peso molecular o una secuencia de nucleótidos, que es esencialmente idéntica o puede considerarse como un alelo al de un producto de amplificación de PCR correspondiente obtenible de la línea de *Solanum habrochaites*, 04TEP990312, NCIMB 41623 en una reacción PCR con el o los pares de cebadores idénticos; o; cualquier marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, se segrega conjuntamente con el rasgo de resistencia a *Botrytis*.

25

En un aspecto de la descripción, dicho producto de amplificación es sustancialmente diferente en longitud del que se puede obtener de una línea de élite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016.

En particular, el producto de amplificación se obtiene en una reacción PCR utilizando

- 30 i. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 205 pb y 235 pb, particularmente entre 210 pb y 230 pb ; particularmente entre 215 pb y 225 pb y/o es entre 10% y 20%, particularmente entre 12% y 18%, en particular aproximadamente 14% más corto que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de élite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;
- 35 ii. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 224 pb y 226 pb y/o es entre 0,4% y 1,8%, particularmente entre 0,8% y 1,5% más largo que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de élite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;
- 40 iii. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 160 pb y 170 pb, particularmente entre 162 pb y 168 pb ; particularmente entre 164 pb y 166 pb y/o es entre 3% y 10%, particularmente entre 5% y 9%, en particular aproximadamente 6% más corto que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de élite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;
- 45 iv. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 85 pb y 95 pb, particularmente entre 88 pb y 92 pb; y/o es entre 5% y 15%, particularmente entre 8% y 12%, en particular aproximadamente 11% más corto que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de élite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;
- 50 v. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 290 pb y 320 pb, particularmente entre 280 pb y 310 pb; y/o es entre 5% y 15%, particularmente entre 8% y 12%, en

particular aproximadamente 10% más corto que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de élite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016;

- 5 vi. un par de cebadores que comprenden un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12, que conduce a un producto de amplificación, que está en un intervalo de entre 140 pb y 160 pb, particularmente entre 145 pb y 155 pb; y/o es entre 10% y 30%, particularmente entre 15% y 25%, en particular aproximadamente 20% más corto que el fragmento correspondiente obtenible de una línea de élite de *S. lycopersicum*, particularmente la línea W5016.

10 En una primera etapa, las muestras de ADN o de ADNc se obtienen a partir de material vegetal adecuado, tal como tejido de la hoja, mediante la extracción de ADN o ARN utilizando técnicas conocidas. Los cebadores que flanquean una región que contiene SSRs dentro del locus de rasgos cualitativos relevantes para la invención descritos anteriormente en esta memoria o dentro de una región enlazada al mismo, se utilizan luego 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..

15 Básicamente, el método de amplificación por PCR implica el uso de un cebador o un par de cebadores que comprenden dos secuencias cortas de cebadores oligonucleotídicos 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  
20 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  
25 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.

30 Mediante 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 se encuentran entre los cebadores flanqueantes en diferentes alelos, se reflejan en variaciones de longitud 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.

35 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 sonda indicadora fluorescente.

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

45 Además, mediante el uso de marcadores moleculares, se puede hacer una distinción entre plantas homocigóticas que llevan dos copias del alelo deseado, relevante para la invención en el locus cuantitativo de resistencia a *Botrytis* y plantas heterocigóticas que llevan sólo una copia y plantas que no contienen cualquier copia del o de los alelos favorables.

Así, los marcadores alternativos pueden por lo tanto desarrollarse por métodos conocidos por la persona experta y utilizarse para identificar y seleccionar plantas con un alelo o un conjunto de alelos de un locus o loci de rasgos cuantitativos de acuerdo con la presente invención y como se describe anteriormente en esta memoria .

50 Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del producto de amplificación obtenido en la amplificación por PCR utilizando un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR que comprenden

- i. un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2, o
- ii. un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4, o
- iii. un cebador directo de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 6, o
- iv. un cebador directo de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 8, o

v. un cebador directo de SEQ ID NO: 9 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 10, o

vi. un cebador directo de SEQ ID NO: 11 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 12, o

cualquier marcador adyacente en al menos un grupo de enlace seleccionado del grupo de enlace 6, el grupo de enlace 1b y el grupo de enlace 9b que está estadísticamente correlacionado y, por lo tanto, se co-segrega conjuntamente con el rasgo de resistencia a *Botrytis*,

pueden obtenerse pro los expertos en la técnica y nuevos cebadores o pares de cebadores diseñados en base a la secuencia de nucleótidos recientemente 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 tomate u otras especies, en particular especies de la familia *Solanaceae* y podrían utilizarse marcadores de mapeo conocidos en la misma región o regiones del homólogo o del ortólogo. como punto de partida para desarrollar nuevos marcadores.

Por consiguiente, los marcadores específicamente descritos en la presente invención también se pueden utilizar en la identificación y/o el desarrollo de marcadores nuevos o adicionales asociados con el locus cuantitativo de resistencia a *Botrytis*, que a su vez se puede utilizar en la reproducción asistida por marcadores y/o la búsqueda de recombinantes que flanquean el locus de resistencia a *Botrytis*, y/o mapeo de precisión, y/o la clonación del locus cuantitativo de resistencia a *Botrytis*.

Existen varios métodos o enfoques disponibles, conocidos por los expertos en la técnica, que pueden utilizarse para identificar y/o desarrollar marcadores en el desequilibrio de enlace y/o enlazados y/o ubicados en la región de interés, también como marcadores que representan las mutaciones causales reales subyacentes al rasgo cuantitativo. Sin ser completamente exhaustivos, algunos enfoques, conocidos por los expertos en la técnica, incluyen:

- *Uso de secuencias marcadores descritos /en enfoques de hibridación para identificar otra secuencia en la región de interés:*secuencias de cebadores tal como se describen en esta memoria y/o secuencias de marcadores/genes (o parte de las mismas) que se pueden determinar utilizando las secuencias de cebadores tal como se describen en esta memoria, utilizado como sondas (de hibridación) para aislar secuencias/genes de ácido nucleico que flanquean los marcadores y/o enlazados y/o asociados y/o específicos para el locus de resistencia a *Botrytis*de una muestra de ácido nucleico genómico y/o una muestra de ARN o ADNc o un conjunto de muestras (por ejemplo, rastreo de recursos genómicos tales como colecciones de BAC o detección de colecciones de ADNg o ADNc).
- *Uso de secuencias marcadores descritos /en enfoques de PCR para identificar otra secuencia en la región de interés:* secuencias de cebadores tal como se describen en esta memoria y/o secuencias de marcadores/genes (candidatos) (o parte de las mismas) que se pueden determinar utilizando las secuencias de cebadores tal como se describen, se pueden utilizar como cebadores de amplificación (PCR) para amplificar una secuencia de ácido nucleico/gen y/o enlazado y/o asociado con y/o específico para la región del locus de resistencia a *Botrytis* a partir de una muestra de ácido nucleico genómico y/o muestra de ARN o ADNc o conjunto de muestras aisladas o no de un tejido vegetal específico y/o después de un tratamiento específico de la planta y de *Solanum* spp. o en principio cualquier otro organismo con suficiente homología.
- *Uso de secuencias/ marcadores descritas en enfoques de PCR para identificar otra secuencia en la región de interés:* las secuencias de nucleótidos/genes de uno o más marcadores pueden determinarse después de que los cebadores internos para dichas secuencias de marcadores puedan diseñarse y utilizarse para determinar adicionalmente el flanqueo adicional de secuencias/genes dentro de la región del locus de resistencia a *Botrytis* y/o genéticamente enlazados y/o asociados con el rasgo.
- *Uso de secuencias/marcadores descritos en el mapeo y /o enfoques de mapeo comparativo para identificar marcadores en la o las mismas regiones (posicionamiento del locus de resistencia de Botrytis en otros mapas):* basado en información de posición y/o información de marcador tal como se describe en esta memoria, los marcadores, de cualquier tipo, pueden identificarse mediante enfoques de mapeo genético, finalmente (si ya es necesario) mediante el posicionamiento de los marcadores descritos (mediante mapeo genético o extrapolación basada en marcadores comunes a través de mapas) en uno o más mapas genéticos (de alta densidad) , y/o mapas genéticos o de consenso integrados. Los marcadores ya conocidos y/o nuevos marcadores genéticamente enlazados y/o situados en la vecindad de los marcadores descritos y/o la región del locus de resistencia a *Botrytis* pueden identificarse y/u obtenerse y finalmente utilizarse en mapeo (de precisión) y/o en la clonación del locus de resistencia a *Botrytis* y/o aplicaciones MAS.
- *uso de secuencias /marcadores descritos en enfoques 'in-silico' para identificar secuencias /marcadores adicionales /genes (candidatos):* Secuencias de cebadores tal como se describen en esta memoria y/o secuencias de marcadores/genes (candidatos) (o parte de las mismas) que se pueden determinar utilizando las secuencias de cebador tal como se describen en esta memoria o basadas en marcadores enlazados

puede utilizarse en métodos 'in-silico' para buscar secuencias de bases de datos de proteínas (p. ej., BLAST) para secuencias/genes de flanqueo y/u homólogas (adicionales) y/o diversidad alélica (tanto secuencias genómicas y/o de ADNc o incluso proteínas y ambas procedentes de *Solanum* spp. y/o cualquier otro organismo) genéticamente enlazadas y/o asociadas con los rasgos tal como se describen en esta memoria y/o ubicadas en la región del locus de resistencia a *Botrytis*.

- *uso de secuencia/marcadores descritos en enfoques de mapeo físicos (colocando el locus de resistencia a Botrytis en el mapa físico o en la secuencia del genoma):* secuencias de cebadores tal como se describen en esta memoria y/o secuencias de marcadores/genes (o parte de las mismas) que pueden determinarse utilizando las secuencias de cebador tal como se describen en esta memoria o utilizando otros marcadores genéticamente enlazados a los marcadores descritos en esta memoria y/o ubicados en la región del locus de resistencia a *Botrytis* se pueden colocar en un mapa físico y/o secuencia del genoma (completo) en principio de cualquier organismo con homología suficiente para identificar secuencias/marcadores/genes (candidatos) aplicables en el (mapeo de precisión) y/o la clonación del locus de resistencia a *Botrytis* y/o aplicaciones de reproducción MAS.
- *uso de secuencias/marcadores descritos para disponer el locus de resistencia a Botrytis en otros mapas (físicos) o genomas (a través de las especies....para tomate distintas de especies de Solanaceae se pueden utilizar como especies modelo):*secuencias de cebadores tal como se describen en esta memoria y/o secuencias de marcadores/genes (o parte de las mismas) que se pueden determinar utilizando las secuencias de cebadores tal como se describen en esta memoria se pueden utilizar en enfoques de mapeo de genoma o sintenia comparativos para identificar regiones homólogas y secuencias homólogas y/u ortólogas/genes (candidatos) genéticamente enlazados y/o situados en la región del locus de resistencia a *Botrytis* y aplicable en (mapeo de precisión) y/o clonación del locus de resistencia a *Botrytis* y/o aplicaciones de reproducción MAS.
- *Uso de secuencias/marcadores descritos para seleccionar los individuos apropiados que permitan la identificación de marcadores en la región de interés mediante enfoques genéticos:*las secuencias de cebadores y/o marcadores tal como se describe en esta memoria pueden utilizarse para seleccionar individuos con alelos diferentes/contrastantes que, por ejemplo, en los enfoques de asociación genética y/o el análisis segregante a granel (BSA, Michelmore et al., PNAS, 88, 9828-9832, 1991) se pueden utilizar para identificar marcadores/genes en la región específica de interés y/o asociados o genéticamente enlazados a los rasgos descritos
- *uso de la información descrita para rastrear genes (posicionales) candidatos:*la información descrita puede utilizarse para identificar genes candidatos posicionales y/o funcionales que pueden estar asociados con los rasgos descritos y/o enlazados genéticamente.

Para el genotipado, mapeo o mapeo de asociación, el ADN se extrae de material vegetal adecuado tal como, por ejemplo, tejido de hoja. En particular, se recogen grandes cantidades de hojas de una pluralidad de plantas. Las muestras de ADN se genotipan utilizando una pluralidad de SSRs polimórficos, SNPs o cualquier otro tipo de marcador adecuado que cubra todo el genoma del tomate.

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 se pueden rastrear para detectar los alelos en el correspondiente locus de resistencia a *Botrytis* descrito en esta memoria, en base a la o las secuencias de nucleótidos del o de los marcadores en el locus/los loci de marcador enlazados a dicho locus de resistencia a *Botrytis* o cualquier otro marcador, 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.

La secuencia de ácido nucleico de los marcadores, los marcadores enlazados o el locus de resistencia a *Botrytis* descrito en esta memoria puede determinarse por métodos conocidos por la persona experta. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que comprende dicho locus de resistencia a *Botrytis* o una parte del mismo que confiere resistencia puede aislarse de una planta donante resistente a *Botrytis* fragmentando el genoma de dicha planta y seleccionando aquellos fragmentos que albergan uno o más marcadores indicativos de dicho locus de resistencia a *Botrytis*. Posterior, o alternativamente, las secuencias de marcadores (o partes de las mismas) indicativas de dicho locus de resistencia pueden utilizarse como cebadores de amplificación (PCR), con el fin de amplificar (a) una secuencia o secuencias de ácido nucleico que comprenden dicho locus de resistencia forman una muestra de ácido nucleico genómico o un fragmento de genoma obtenido de dicha planta. La secuencia de nucleótidos del locus de resistencia a *Botrytis*, y/o de cualquier marcador adicional comprendido en el mismo, se puede obtener mediante métodos de secuenciación estándares.

La presente invención, por lo tanto, también se refiere a un ácido nucleico aislado (preferentemente ADN, pero no limitado a ADN), secuencia que comprende un locus de resistencia a *Botrytis* de la presente invención, o una parte que confiere resistencia a los mismos. Por lo tanto, los marcadores descritos pueden utilizarse para la identificación y el aislamiento de uno o más marcadores o genes de tomate u otros cultivos de hortalizas, particularmente cultivos de *Solanaceae* que están enlazados o codifican resistencia a *Botrytis*.

La secuencia de nucleótidos de marcadores adicionales enlazados al locus de resistencia a *Botrytis* de la presente invención, por ejemplo, también puede resolverse determinando la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores asociados con el locus de resistencia a *Botrytis* y diseñando cebadores para dichas secuencias de marcadores que pueden luego utilizarse para determinar adicionalmente la secuencia fuera de dicha secuencia del marcador. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de los marcadores de SSR descritos en esta memoria o cualquier otro marcador predicho en la región del locus de resistencia a *Botrytis* y/o enlazado a dicha región puede obtenerse secuenciando el producto de amplificación por PCR de dichos marcadores mediante métodos bien conocidos en la técnica. O, alternativamente, utilizando las secuencias de marcadores en una PCR o como sondas de hibridación para identificar secuencias de nucleótidos enlazadas mediante, por ejemplo, pero no limitadas a rastreo de BAC.

La presente invención se describe adicionalmente por referencia a los siguientes figuras, tablas y ejemplos no limitantes.

La Figura 1 muestra la distribución de los dos rasgos que se han utilizado para detectar QTLs para la tolerancia a *Botrytis* en la población F4 RIL (derivada del cruce entre la línea A y la línea B).

La Figura 2 muestra el mapa genético de los grupos de enlace en donde se han detectado QTL para la tolerancia a *Botrytis* en la población F4 RIL (derivada del cruce entre la línea A y la línea B).

La Tabla A muestra QTL detectado en la población de la línea endogámica recombinante F4 derivada del cruce entre la línea A y la línea B para la tolerancia a *Botrytis cinerea*. Los rasgos para los que se ha realizado la detección de QTL son el tamaño de la lesión (ls) y el logaritmo del tamaño de la lesión (lg (ls)). Cada QTL se nombra con el prefijo BcT (para la tolerancia de *Botrytis cinerea*) seguido del número del cromosoma y un número distintivo.

La descripción anterior se entenderá más completamente con la referencia a los siguientes Ejemplos. Estos ejemplos son, sin embargo, métodos ilustrativos de poner en práctica la presente invención.

## EJEMPLOS

### MATERIALES

#### 1. Material Fuente de resistencia a Botrytis

Se identificó la resistencia a *Botrytis* y se obtuvo a partir de *S. habrochaites* acceso PI 247087. Para este acceso se puede proporcionar el siguiente historial de fuentes:

- El acceso se recogió en Ecuador, 01-enero-1958.
- Localidad: en la ribera entre Catamayo y Gonzanama, Hacienda Colca, Loja.
- Recolectores: Correll, D., Crops Research Division - USDA-ARS.
- El acceso se donó. 09-abril-1958 Maryland, Estados Unidos
- Donantes: Correll, D., Crops Research Division - USDA-ARS. Mantenido por Northeast Regional PI Station. USDA, ARS, National Genetic Resources Program, 630 W. North Street, Geneva, Nueva York
- NPGS recibido: 09-abril-1958 PI asignado: 1958. Lanzado en 1958.

#### 2. Cepa de hongos

Un aislado agresivo de *Botrytis cinerea* se utilizó para las evaluaciones fenotípicas de la población para el análisis QTL y también para líneas e híbridos. La cepa se mantuvo en placas de *Petri* con medio sólido de agar de dextrosa de patata al 2% (PDA) a temperatura controlada a 20°C. Al medio PDA sólido se añadieron 2 g de PDA por litro de agua. El material se esterilizó en autoclave a esterilidad, se enfrió y se vertió sobre placas de *Petri*.

Se hizo un subcultivo mensual a partir de un pequeño trozo de agar que contiene el micelio en una nueva placa de *Petri* estéril.

#### 3. Evaluación de cámaras climáticas - Inoculación con micelio

Se obtuvieron cultivos activo después de 5 días a temperatura controlada a 20°C. Se tomó un trozo de agar, que contenía micelio, con la base de una punta que generalmente se utiliza con una micropipeta. La punta se utiliza como una "parte de transporte". La punta que contiene el micelio se coloca en la parte restante de una hoja cortada en contacto con el tallo

#### 4. Evaluación de invernadero de plástico - Inoculación con solución de esporas de hongos

De una nueva placa de *Petri*, aparecen esporas del micelio después de 4 semanas. Las esporas se recogen de la placa de *Petri* separando el hongo con un bisturí y se ponen en una solución de agua. Las esporas que contenían

micelio se mezclaron en la solución de agua con un mezclador y se realizó un recuento con una célula Mallassez. La solución de esporas en agua se diluyó a razón de  $1 \cdot 10^6$  esporas/ml.

La inoculación se llevó a cabo con una solución de esporas con 10% de sacarosa (peso/volumen).

**Ejemplo 1: Rastreo del Patotest**

5 **1.1 Colección de Cepas de Botrytis**

Se construyó una colección central a partir de una colección de cepas aisladas en 2004 y 2005. Los aislados se han caracterizado en base a la morfología y las secuencias ITS de ADN.

La colección principal se ha elegido de acuerdo con la morfología de la cepa en placa de Petri en medio PDA (Fabian et al, 2003).

10 **1.2 Evaluación de la población de líneas BC2F4**

Las semillas se sembraron en bandejas con compost adaptado para la siembra. Las bandejas se incubaron en cámaras climáticas con un fotoperíodo de 15 h/9 h (día/noche). La temperatura durante el día fue de  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con una luminosidad de 10 000 lux y durante la noche la temperatura fue de  $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

15 Las plántulas se trasplantan en macetas con compost adecuado aproximadamente 10 días después de la siembra. Las plántulas se cultivaron en cámaras climáticas hasta la quinta o sexta hoja verdadera en condiciones similares. Las plántulas se riegan cada día después del trasplante con una solución nutritiva hasta la inoculación (Liquoplant Bleu de Plantin, Courthezon, Francia; con la siguiente composición de NPK: 2,5 (nitrógeno entero) - 5 (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) -2,5 (K<sub>2</sub>O) -0,75 (MgO) + oligoelementos. La solución se diluye para obtener una electro-conductividad de 2 y un pH de 6,5).

20 La inoculación se llevó a cabo después de 4 semanas de crecimiento. Se podan de 2 hojas de cada una de las plantas. Existe al menos una hoja restante entre las que han sido cortadas. Un micelio de 5 días se utiliza como inóculo.

Un trozo de micelio se coloca en la parte restante de la hoja cortada en contacto con el tallo. El micelio se mantuvo con una punta ajustada junto con la parte restante de la planta.

25 Las plantas se incubaron en cámaras climáticas bajo humedad saturada con una temperatura durante el día de  $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con una luminosidad de 5 000 lux y durante la noche la temperatura era de  $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

30 Los primeros síntomas, necrosis en la parte de la planta cortada herida, aparecieron después del día 3 post-inoculación. La evaluación de los síntomas se realizó sobre la longitud de la necrosis del tallo utilizando una medida cuantitativa en milímetros. La duración de la necrosis se evalúa generalmente después del día 7 post-inoculación. En la referencia susceptible, la longitud de la necrosis es generalmente superior a 30 mm.

Para cada una de las líneas se registra una media de necrosis de longitud de cada una de las plantas de cada uno de los experimentos.

La cámara climática se dividió en 12 unidades experimentales y podía contener 1080 plantas.

35 Se ha llevado a cabo una serie de 6 experimentos con el fin de examinar a toda la población. La unidad experimental primaria era un grupo de 5 plantas F4. Se cultivaron 5 controles resistentes y susceptibles en cada una de las unidades experimentales de la cámara climática.

**1.3 Evaluación de Líneas e Híbridos en un programa de reproducción**

Además del procedimiento arriba descrito para el estudio QTL, se evaluaron líneas e híbridos en condiciones semi-artificiales cerca de las instalaciones de producción del mercado bajo un invernadero de plástico.

40 Las semillas se sembraron en bandejas con compost adaptado para la siembra. Las bandejas se incubaron en cámaras climáticas con un fotoperíodo de 15 h/9 h (día/noche). La temperatura durante el día fue de  $24^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con una luminosidad de 10 000 lux y durante la noche la temperatura fue de  $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Las plántulas se trasplantan en macetas con compost adecuado aproximadamente 10 días después de la siembra. Después de 4 semanas, las plántulas se trasplantaron directamente en el suelo en un invernadero de plástico..

45 La inoculación se llevó a cabo después de 2 meses de crecimiento. Se podan de 2 hojas de cada una de las plantas. Se utilizó solución de  $1 \times 10^6$  esporas/ml de agua con 10% de sacarosa (peso/volumen). El inóculo se extendió inmediatamente después de la poda, en la parte herida. Se realizó una segunda inoculación seguida de una tercera inoculación cada 3 semanas con el mismo protocolo. Después de varias semanas, en la referencia susceptible (la línea de élite de *Solanum lycopersicum*) se observó necrosis en la referencia susceptible (la línea de élite de *Solanum lycopersicum*), lo que resultó en la muerte de la planta. La evaluación de los síntomas se llevó a cabo

50

contando el número de plantas muertas por parcela y midiendo la longitud de necrosis más grande de cada una de las plantas de cada una de las parcelas una vez que al menos el 50% de las plantas susceptibles habían muerto. Para cada línea o híbrido, se registró una media de longitud de la necrosis.

### **Ejemplo 2: Experimento de mapeo con QTL**

#### 5 **2.1 Determinación de QTL**

La resistencia a *Botrytis* ha sido identificada en *S. habrochaites* acceso PI 247087. Este acceso ha sido retrocruzado una vez a una línea de élite de *S. lycopersicum*, y luego se autofecundó durante 3 generaciones, al tiempo que se seleccionaba la planta más resistente en cada una de las generaciones a través del rastreo de pathotest. La misma línea de élite de *S. lycopersicum* se utilizó en el Ejemplo 3 como el control susceptible.

10 La planta BC1F3 más resistente (parental A) se cruzó luego con W5016 (parental B). De este cruce, se ha desarrollado una población de 492 líneas F3 por descendencia de semillas individuales. Se han obtenido semillas F4 de cada una de las plantas F3.

15 Se ha construido un mapa genético en base a las 492 plantas F3 con 161 marcadores de SSR. Los marcadores se agruparon en 19 grupos de enlace, mientras que 10 marcadores permanecieron sin asociar. Se pudieron asignar 17 grupos de enlace a 10 cromosomas del genoma del tomate, mientras que 2 permanecieron sin identificar.

20 La línea F4, resultante de la autofecundación de cada una de las plantas F3, se ha utilizado para caracterizar el nivel de resistencia a *Botrytis cinerea*. La prueba de resistencia se ha realizado en una cámara climática. La cámara climática se dividió en 12 unidades experimentales y podía contener 1080 plantas. Las plantas se inocularon en la fase de 5/6 hojas, es decir, 30 a 40 días después de la siembra. Cada una de las plantas se inoculó en 2 nodos diferentes. La resistencia se midió como la extensión de la lesión necrótica en milímetros, 7 días después de la inoculación. Se ha llevado a cabo una serie de 6 experimentos en total con el fin de rastrear a toda la población. La unidad experimental primaria era un grupo de 5 plantas F4, que representan la correspondiente planta F3. Cada una de las plantas F3 ha sido evaluada a través de al menos dos muestras de 5 plantas F4. Se cultivó un control resistente y uno susceptible en cada una de las unidades experimentales de la cámara climática.

25 La longitud de la lesión necrótica se ha medido en milímetros en los dos puntos de inoculación de cada una de las plantas. Luego, la longitud de la lesión se ha promediado a lo largo de todas las plantas F4 y todas las repeticiones de una planta F3 dada. Los datos provenientes de una unidad experimental dada no se consideraron si los síntomas no se expresaban completamente en el control susceptible (longitud promedio de la lesión menor de 20 mm). Los rasgos utilizados para la detección de QTL fueron la longitud de la lesión (ls) y el logaritmo de la longitud de la lesión (lg (ls)). La distribución de los dos rasgos se da en la figura 1.

30 La detección de QTL se realizó con el software QTLCartographer (CJ Basten, P Gaffney, ZB Zeng, North Carolina State University, 2006). El modelo estadístico utilizado para la detección fue un modelo de mapeo de intervalo compuesto (CIM). Se utilizó la opción con selección de cofactores mediante regresión hacia adelante y hacia atrás, con una probabilidad de entrada y salida en  $p = 5\%$ . El umbral para considerar un QTL como presente fue  $LOD = 3$ . La estadística de resumen QTL, es decir, la puntuación LOD, el efecto genético (a) y el porcentaje de varianza explicado ( $R^2$ ) se dan en la tabla A. El signo del efecto genético es negativo cuando el alelo resistente se hereda del parental A y el signo es positivo cuando proviene del parental B. Los resultados para el mapeo de intervalo simple (SIM), otro método clásico de detección de QTL, también se dan en la tabla A. Se han obtenido un total de 4 QTLs detectados, en 3 casos, el alelo favorable (es decir, el alelo que presenta el mayor nivel de resistencia que es la lesión necrótica más pequeña) fue el heredado del parental A, mientras que en un caso el alelo favorable fue heredado del parental B.

Los 3 QTLs con efecto de resistencia procedentes del parental A son:

- 45 • QTL BCT6.1. El pico de la puntuación LOD está entre la posición 34 y 38 cM dependiendo del rasgo y el método estadístico, es decir, entre los marcadores NT1293 y NT3736. El porcentaje de varianza explicado es entre 11% y 14%.
- QTL BCT1.2. El pico de la puntuación LOD está entre la posición 42 y 52 cM dependiendo del rasgo y el método estadístico, es decir, entre los marcadores NT1597 y NT4636. El porcentaje de varianza explicado es entre 10% y 14%.
- 50 • QTL BCT9.1. El pico de la puntuación LOD está en la posición 0 cM en el marcador NT5734.. El porcentaje de varianza explicado es 7%. El intervalo de confianza de 2-LOD incluye los marcadores NT5734 y NT5921.

El mapa genético de los grupos de enlace 6, 1a, 1b y 9b se proporciona en la figura 2. La información que permite genotipar estos marcadores flanqueantes se proporciona en la tabla 3.

## ES 2 749 966 T3

Tabla 1: Sumario del tamaño de los amplicones para los marcadores flanqueantes

Marcador	alelo R de 04TEP990312 (en pb)	alelo S de W5016 (en pb)	Precisión	Método de medición
NT1293	220	250	± 7 pb	Gel de agarosa
NT3736	225	222	± 1 pb	Secuencia
NT1597	165	175	± 5 pb	Gel de agarosa
NT4636	90	100	± 5 pb	Gel de agarosa
NT5734	300	330	± 7 pb	Gel de agarosa
NT5921	150	180	± 5 pb	Gel de agarosa

### Ejemplo 3: Resultados de Líneas y Evaluación de los Híbridos

Tabla 2: Resultados del pathotest de acuerdo con el Ejemplo 1 en una línea de élite de *S.lycopersicum* susceptible y la línea 04TEP990312

Cepas Core Collection de <i>B. cinerea</i>	Necrosis			
	04TEP990312	$\sigma$	<i>S.lycopersicum</i>	$\sigma$
BcT1	4,9	3,1	49,8	14,1
BcT29B	3,7	0,5	48,1	12,2
BcT7A	4,6	1,6	46,1	15,5
BcT24	3,8	0,5	42,7	10,0
BcT8C	4,4	1,1	39,9	13,1
BcT5A	3,9	0,3	32,3	13,6
BcT7C	3,8	0,5	31,4	16,5
BcT19	3,8	0,9	30,4	10,4
BcT10A	3,4	0,3	28,6	14,5
BcT6E	3,8	0,9	25,6	13,5
BcF3A2	3,9	0,5	23,6	10,9
BcF3A1	3,6	0,3	23,5	8,6
BcT6D	3,8	0,8	23,1	6,1
BcF1	4,3	0,7	23,0	10,9
BcT35B	4,0	0,5	22,7	9,2

Cepas Core Collection de <i>B. cinerea</i>	Necrosis			
	04TEP990312	$\sigma$	<i>S.lycopersicum</i>	$\sigma$
BcL3	3,8	0,5	21,5	8,7
BcL1A	5,1	3,6	17,4	4,1
BcL5B	3,8	0,2	16,9	6,6

En la línea de élite de *S. lycopersicum* susceptible, todas las cepas son virulentas y muestran diferentes niveles de agresividad.

5 En la línea donante resistente 04TEP990312, todas las cepas no desarrollaron lesiones del tallo y podrían considerarse avirulentas en este genotipo resistente.

**Ejemplo 4: Datos fenotípicos en líneas que albergan QTL(s)**

**4.1 1<sup>er</sup> Experimento:**

10 29 líneas avanzadas BC4F3; previamente seleccionados de acuerdo con su fenotipo durante cada uno de los ciclos previos; han sido genotipados y se han encontrado fijadas para la introgresión de *Solanum habrochaites* (04TEP990312) para el QTL BCT6.1. Estas líneas han sido evaluadas juntas y comparadas con una referencia susceptible, una línea de élite (TS) susceptible de *Solanum lycopersicum* utilizada como recurrente en un programa de retrocruzamiento. También se han incluido en el experimento una referencia resistente (TR), una línea BC2F5 que alberga el alelo de resistencia en los 3 QTL (BCT1.2, BCT6.1 y BCT9.1).

Cada una de las líneas ha sido evaluada de acuerdo con el procedimiento descrito en el **ejemplo 1** en 24 plantas.

15 La significancia estadística de los valores transformados Log10 de la longitud de necrosis (mm) se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA). La prueba de rango múltiple de Duncan se utilizó para detectar diferencias significativas al nivel de significancia del 5% entre líneas que llevan la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) para el QTL BCT6.1 y líneas sin esta introgresión.

**4.1.1 Botrytis cepa BcT1**

Agrupación de Duncan	Log10	N	BCT6.1
A	1,57	10	TS
B	1,23	10	TR
<b>B</b>	<b>1,22</b>	<b>29</b>	<b>P</b>

TS = línea de élite susceptible de *S. lycopersicum*

TR = línea de élite resistente de *S. lycopersicum*

**P = líneas BC4F3 homocigóticas para la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT6.1**

20 En este experimento, las líneas BC4F3, homocigotas para la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT6.1, son significativamente diferentes de la línea de élite susceptible de ***S. lycopersicum***. Estas líneas mostraron una reducción significativa de la longitud de la necrosis.

**4.2 2<sup>o</sup> Experimento:**

25 Los siguientes dos experimentos difieren de acuerdo con las cepas de referencia de *Botrytis cinerea* utilizadas. En el 1<sup>er</sup> experimento, las líneas han sido enfrentadas a la cepa BcT1 y en el 2<sup>o</sup> experimento, las líneas han sido enfrentadas a la cepa BcT19. Las cepas difieren en su nivel de agresividad.

Se han seleccionado y comparado líneas 76 BC4F3, procedentes de las mismas poblaciones F2, homocigotos para la introgresión (04TEP990312) de *S. habrochaites* u homocigotos para *S. lycopersicum* para la BCT6.1 QTL.

Cada una de las líneas ha sido evaluada en 2 experimentos independientes de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1 en 12 plantas.

- 5 La importancia estadística de los valores transformados Log10 de la longitud de necrosis (mm) se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA). La prueba de rango múltiple de Duncan se utilizó para detectar diferencias significativas al nivel de significancia del 5% entre las líneas que llevan la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) para el QTL BCT6.1 y las líneas sin esta introgresión.

**4.2.1 Botrytis cepa BcT1;**

Agrupación de Duncan	Log10	N	BCT6.1
A	1,32	11	TS
<b>A</b>	<b>1,24</b>	<b>42</b>	<b>A</b>
<b>B</b>	<b>1,08</b>	<b>34</b>	<b>P</b>
C	0,96	11	TR

TS = línea de élite susceptible de *S. lycopersicum*  
 TR = línea de élite resistente de *S. lycopersicum*  
**A = líneas BC4F3 sin la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT6.1**  
**P = líneas BC4F3 homocigóticas para la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT6.1**

10

**4.2.2 Botrytis cepa BcT19::**

Agrupación de Duncan	Log10	N	BCT6.1
A	1,82	11	TS
<b>B</b>	<b>1,77</b>	<b>42</b>	<b>A</b>
<b>C</b>	<b>1,66</b>	<b>34</b>	<b>P</b>
D	1,33	11	TR

TS = línea de élite susceptible de *S. lycopersicum*  
 TR = línea de élite resistente de *S. lycopersicum*  
**A = líneas BC4F3 sin la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT6.1**  
**P = líneas BC4F3 homocigóticas para la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT6.1**

En los dos experimentos independientes, existe una diferencia significativa entre las líneas homocigotas con y sin la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) para el QTL BCT6.1. Las líneas con la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) mostraron una reducción significativa de la longitud de la necrosis.

15 **4.3 3<sup>er</sup> Experimento:**

Los tres siguientes experimentos difieren de acuerdo con las cepas de referencia utilizadas de *Botrytis cinerea*. En el 1<sup>er</sup> y en el 2<sup>o</sup> experimento, las líneas han sido enfrentadas a la cepa BcT1 y en el 3<sup>er</sup> experimento, las líneas han sido enfrentadas a la cepa BcT19. Las cepas difieren en su nivel de agresividad.

Se han seleccionado 21 líneas BC3F3, procedentes de las mismas poblaciones F2, de acuerdo con QTLs BCT1.2 o BCT9.1. Estas líneas que albergan en la fase homocigota QTL BCT1.2 o QTL BCT9.1 se han comparado en tres experimentos independientes con el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

- 5 Cada una de las líneas ha sido sometida a ensayo en 40 plantas con 4 réplicas de 10 plantas. La significancia estadística de los valores transformados Log10 de la longitud de necrosis (mm) se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA). La prueba de rango múltiple de Duncan se utilizó para detectar diferencias significativas al nivel de significancia del 5% entre las líneas que llevan un QTL y líneas sin el QTL correspondiente.

**4.3.1 Botrytis cepa BcT1;**

Agrupación de Duncan	Log10	N	BCT1.2
A	1,69	12	TS
<b>A</b>	<b>1,67</b>	<b>12</b>	<b>A</b>
<b>B</b>	<b>1,53</b>	<b>8</b>	<b>P</b>
C	1,17	12	TR

TS = línea de élite susceptible de *S. lycopersicum*  
 TR = línea resistente de *S. lycopersicum*  
**A = líneas BC4F3 sin la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT1.2**  
**P = líneas BC4F3 homocigóticas para la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT1.2**

10 **4.3.2 Botrytis cepa BcT1;**

Agrupación de Duncan	Log10	N	BCT9.1
A	1,68	12	TS
<b>A</b>	<b>1,66</b>	<b>14</b>	<b>A</b>
<b>B</b>	<b>1,52</b>	<b>6</b>	<b>P</b>
C	1,17	12	TR

TS = línea de élite susceptible de *S. lycopersicum*  
 TR = línea resistente de *S. lycopersicum*  
**A = líneas BC4F3 sin la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT9.1**  
**P = líneas BC4F3 homocigóticas para la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT9.1**

**4.3.3 Botrytis cepa BcT1;**

Agrupación de Duncan	Log10	N	BCT1.2
A	1,72	12	TS
<b>B</b>	<b>1,67</b>	<b>13</b>	<b>A</b>

Agrupación de Duncan	Log10	N	BCT1.2
<b>C</b>	<b>1,56</b>	<b>8</b>	<b>P</b>
D	1,18	12	TR

TS = línea de élite susceptible de *S. lycopersicum*  
 TR = línea resistente de *S. lycopersicum*  
**A = líneas BC4F3 sin la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT1.2**  
**P = líneas BC4F3 homocigóticas para la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT1.2**

**4.3.4 Botrytis cepa BcT1;**

Agrupación de Duncan	Log10	N	BCT9.1
A	1,72	12	TS
<b>B</b>	<b>1,64</b>	<b>15</b>	<b>A</b>
<b>C</b>	<b>1,59</b>	<b>6</b>	<b>P</b>
D	1,18	12	TR

TS = línea de élite susceptible de *S. lycopersicum*  
 TR = línea resistente de *S. lycopersicum*  
**A = líneas BC4F3 sin la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT9.1**  
**P = líneas BC4F3 homocigóticas para la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT9.1**

**4.3.5 Botrytis cepa BcT19;**

Agrupación de Duncan	Log10	N	BCT1.2
A	1,74	12	TS
<b>B</b>	<b>1,55</b>	<b>13</b>	<b>A</b>
<b>C</b>	<b>1,48</b>	<b>7</b>	<b>P</b>
D	1,14	12	TR

TS = línea de élite susceptible de *S. lycopersicum*  
 TR = línea resistente de *S. lycopersicum*  
**A = líneas BC4F3 sin la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT1.2**  
**P = líneas BC4F3 homocigóticas para la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT1.2**

**4.3.6 Botrytis cepa BcT19;**

Agrupación de Duncan	Log10	N	BCT9.1
A	1,74	12	TS
<b>B</b>	<b>1,53</b>	<b>14</b>	<b>A</b>
<b>B</b>	<b>1,51</b>	<b>6</b>	<b>P</b>
C	1,14	12	TR

TS = línea de élite susceptible de *S. lycopersicum*

TR = línea resistente de *S. lycopersicum*

**A = líneas BC4F3 sin la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT9.1**

**P = líneas BC4F3 homocigóticas para la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT9.1**

5 En los tres experimentos independientes, existe una diferencia significativa entre las líneas homocigotas con y sin la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT1.2. Las líneas que albergan la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BcT1 mostraron una reducción significativa de la longitud de la necrosis en comparación con las líneas sin esta introgresión.

10 En los dos experimentos independientes, en que las líneas han sido enfrentadas a la cepa BcT1, las líneas con la introgresión de *S. habrochaites* (04TEP990312) en el QTL BCT9.1 mostraron una reducción significativa de la longitud de necrosis en comparación con las líneas sin esta introgresión. En el 3<sup>er</sup> experimento en el que las líneas han sido enfrentadas a la cepa BcT19, el experimento no mostró una diferencia significativa entre estas líneas para la QTL BCT9.1 .

**Depósito:**

La siguiente muestra de semilla de *Solanum habrochaites* 04TEP990312 fue depositada ante NCIMB, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, Reino Unido el 21 de mayo de 2009 bajo las provisiones del Tratado de Budapest a nombre de Syngenta Participations AG:

Designación de la línea de semilla de <i>Solanum habrochaites</i>	Fecha de depósito:	Nº de acceso
04TEP990312	21 de mayo de 2009	NCIMB 41623

15

Tabla 3

Marcador	cromosoma	posición	Cebador F	SEQ ID	Cebador R	SEQ ID
NT1293	cr 6	33,9	GCTTCCATTTTGAACAGC	SEQ ID NO: 1	TAATCTTGGCGACTGCTGAC	SEQ ID NO: 2
NT3736	cr 6	41,3	TCAAAATCAATTCAGAACACTC	SEQ ID NO: 3	ACACTCGGGGCTGAATCAC	SEQ ID NO: 4
NT1597	cr 1b	39,5	GAAATATGTGATAAAACCTGCC	SEQ ID NO: 5	TCCCACGGATTTAAAAGTG	SEQ ID NO: 6
NT4636	cr 1b	56,5	TCAACTTGACCCACTTGTTTC	SEQ ID NO: 7	GAGGTGCTGGTACGATGG	SEQ ID NO: 8
NT5734	cr 9b	0	TTCTTCACTGTTGACAGAGAGAG	SEQ ID NO: 9	CATTAGTTGAGAGTGATACCGC	SEQ ID NO: 10
NT5921	cr 9b	12,4	CCACCATCATCATCAACAATC	SEQ ID NO: 11	AACGTGTTCCAATCACCAGC	SEQ ID NO: 12

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syngenta Participations AG

<120> Plantas de tomate resistentes a enfermedades”

<130> R1336 EP BS

5 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

< 211> 19

< 212> ADN

10 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador directo

<400> 1

gcttcattt tgaacagc 19

15 <210> 2

< 211> 19

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

20 < 223> Cebador inverso

<400> 2

taatcttgcg actgctgac 19

<210> 3

< 211> 22

25 < 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador directo

<400> 3

30 tcaaaatcaa ttcagaacac tc 22

<210> 4

< 211> 18

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

35 <220>

< 223> Cebador inverso

<400> 4

acactcgggc tgaatcac 18

<210> 5

40 < 211> 22

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador directo

45 <400> 5

gaaatatgtg ataaaacctg cc 22

<210> 6  
 < 211> 19  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 < 223> Cebador inverso  
 <400> 6  
 tcccacggat ttaaaagtg 19  
 <210> 7  
 10 < 211> 20  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
 <220>  
 < 223> Cebador directo  
 15 <400> 7  
 tcaacttgac ccacttggtc 20  
 <210> 8  
 < 211> 18  
 < 212> ADN  
 20 < 213> Secuencia artificial  
 <220>  
 < 223> Cebador inverso  
 <400> 8  
 gaggtgctgg tacgatgg 18  
 25 <210> 9  
 < 211> 23  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 < 223> Cebador directo  
 <400> 9  
 ttcttactg ttgacagaga gag 23  
 <210> 10  
 < 211> 22  
 35 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
 <220>  
 < 223> Cebador inverso  
 <400> 10  
 40 cattagttga gagtgatacc gc 22  
 <210> 11  
 < 211> 20  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 < 223> Cebador directo  
 <400> 11  
 ccacatcat catcacaatc 20

## ES 2 749 966 T3

<210> 12  
< 211> 19  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia artificial

5 <220>  
< 223> Cebador inverso

<400> 12  
aacgtgttcc aatcacgac 19

10

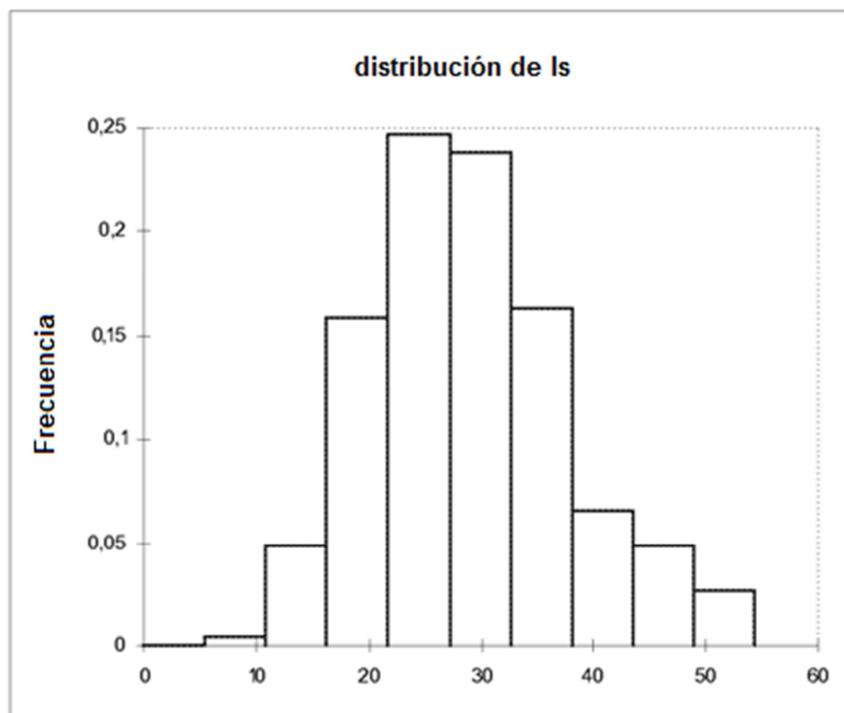
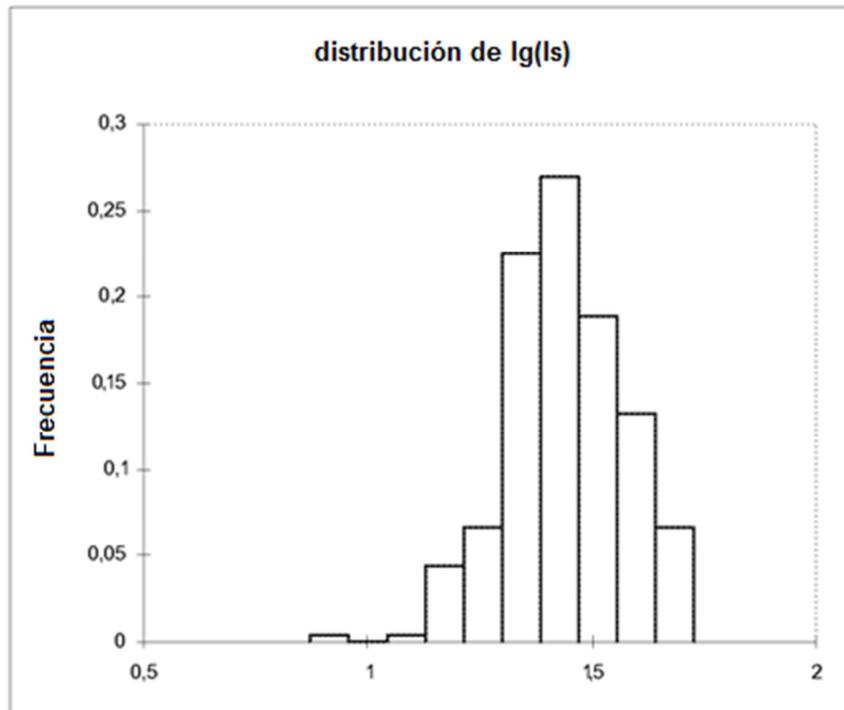
**REIVINDICACIONES**

1. Un marcador de ADN, que está enlazado al grupo de enlace 6 del locus de resistencia a *Botrytis cinerea* de la planta de tomate 04TEP990312, cuya semilla fue depositada bajo el Número de Depósito NCIMB 41623, y que puede amplificarse por un par de cebadores de oligonucleótidos de PCR seleccionados de

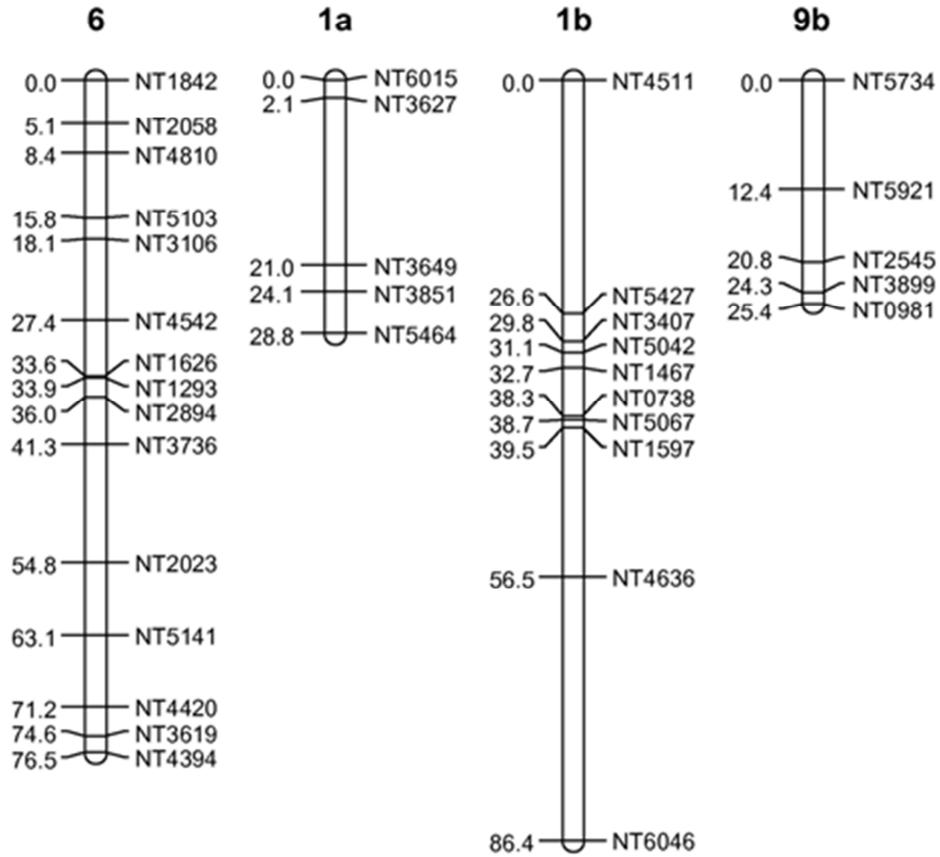
- 5
- i. par de cebadores 1 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 2,
  - ii. par de cebadores 2 representado por un cebador directo de SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO: 4.

2. Uso de algunos o todos los marcadores de ADN de la reivindicación 1

- 10
- i. para la selección diagnóstica de dicho locus de resistencia a *Botrytis cinerea* en una planta de tomate, o
  - ii. para identificar en una planta de tomate la presencia de dicho locus de resistencia a *Botrytis cinerea* y/o para vigilar la introgresión de dicho locus de resistencia a *Botrytis cinerea* en una planta de tomate, particularmente una planta de *Solanum lycopersicum*.



**Figura 1**



**Figura 2**

QTL	grupo enlace	RASGO	MODO L	posición (cM)	LOD	a	R2	2-LOD intervalo de confianza (cM)
		lg(ls)	CIM	38	10,7	-0,07	14%	31-41
BCT6.1	6		SIM	36	9,3	-0,09	19%	31-41
		ls	CIM	34	9,1	-4,23	11%	29-41
			SIM	38	7,9	-4,89	15%	31-40
		lg(ls)	CIM	6	5,3	0,08	8%	0-14
BCT1.1	1a		SIM	6	7,1	0,09	15%	0-14
		ls	CIM	6	6,4	6,39	10%	0-14
			SIM	4	9,2	7,06	23%	0-12
		lg(ls)	CIM	48	9,9	-0,06	14%	29-57
BCT1.2	1b		SIM	42	12,2	-0,08	24%	29-56
		ls	CIM	52	7,7	-3,04	10%	27-57
			SIM	40	11,5	-4,94	21%	30-57
		lg(ls)	CIM	0	6,0	-0,03	7%	0-6
BCT9.1	9b		SIM	0	3,0	-0,03	6%	0-8
		ls	CIM	0	6,4	-2,36	7%	0-6
			SIM	0	2,9	-1,96	6%	0-8

**Tabla A**