

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 104**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 5/08 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2009 PCT/US2009/040676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009 WO09129314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2009 E 09732484 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2268127**

54 Título: **Plantas de pepino resistentes al mildiu veloso**

30 Prioridad:

16.04.2008 US 45551

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

30.03.2020

73 Titular/es:

**SEMINIS VEGETABLE SEEDS, INC. (100.0%)
800 N. Lindbergh Blvd.
St. Louis, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**SHETTY, NISCHIT;
VAN KOOTEN, HENK;
SIPEYRE, BRUNO;
GRIT, ALBERT;
KING, JOSEPH;
GRETENKORT, MARIE y
DURAN, M. YOLANDA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 751 104 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 pepino resistentes al mildiu veloso

Campo de la invención

La invención se refiere a procedimientos de selección de plantas de pepino que tienen resistencia a mildiu veloso.

5 Antecedentes de la invención

El pepino (*Cucumis sativus* L.) es un cultivo vegetal popular que se ha cultivado durante varios miles de años y crece en todo el mundo. Las plantas de pepino se cultivan en una amplia gama de climas y en campos abiertos, así como en invernaderos. Los dos tipos principales de fruta de pepino que se cultivan comercialmente hoy en día son para el mercado de producto fresco (rebanado) y el procesamiento (preparación de encurtidos).

- 10 El mildiu veloso (DM) es causado por el hongo *Pseudoperonospora cubensis* (P.c.), que causa pérdidas significativas de cultivos entre muchas especies de Cucurbitáceas, incluido el pepino. La enfermedad se encuentra en todo el mundo y es favorecido por condiciones húmedas y templadas. La enfermedad afecta las plantas cultivadas en invernadero y las plantas cultivadas en el campo. El DM es una de las enfermedades foliares más importantes de las cucurbitáceas, y puede reducir el rendimiento y la calidad de la fruta, y puede matar las plántulas susceptibles.

- 15 Los síntomas de la infección por DM son variables. Los síntomas iniciales incluyen lesiones amarillas agudas e irregulares en la superficie superior de las hojas, que eventualmente se vuelven más distinguibles en ambos lados de las hojas. La parte inferior de las hojas puede exhibir un crecimiento de color gris blanquecino, marrón o azul claro, particularmente en condiciones húmedas. Este crecimiento del vello corresponde a esporas producidas en la superficie inferior de la lesión. Un color amarillento general de las hojas afectadas ocurre típicamente cuando las lesiones se unen en una lesión grande, eventualmente causando que la hoja se marchite y muera. La enfermedad puede progresar bastante rápido, matando el follaje en cuestión de pocos días y dando como resultado una producción y calidad de fruta deficientes. La fruta del pepino no se ve afectada directamente, pero la defoliación mayor expone a la fruta al sol. Una vez que aparece en un cultivo, el DM se propaga rápidamente por el viento o la lluvia que salpica y/o el agua de riego. La gestión y prevención de enfermedades requiere la destrucción de todas las plantas de viveros infectados y la desinfección de las instalaciones. La aparición de un nuevo aislado de DM también ha superado algunas líneas resistentes previamente conocidas. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas variedades de pepino que tengan resistencia al DM.

Sumario de la invención

- 30 Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para seleccionar una planta de pepino que tiene resistencia a mildiu veloso que comprende seleccionar al menos una primera planta de pepino de progenie resultante del cruce de una planta de pepino de acceso PI197088 que comprende resistencia a mildiu veloso y un primer marcador que es predictivo de la presencia de un locus que contribuye a la resistencia a mildiu veloso con una segunda planta de pepino que tiene al menos un rasgo deseado, en el que dicha primera planta de pepino de progenie comprende dicho primer marcador genético, en el que la selección comprende identificar la presencia de al menos el primer marcador genético en la primera progenie, y en donde dicho primer marcador genético se selecciona de los marcadores CAPs_21826 definidos por el par de cebadores de SEQ ID NOs: 14 y 15, CAPs_ENK60 definido por el par de cebadores de SEQ ID NOs: 1 y 2, CAPs_ENK59 definidos por el par cebador de SEQ ID NOs: 3 y 4, CAPs_17170 definidos por el primer par de SEQ ID NOs: 5 y 6, CAPs_17179 definidos por el primer cebador de S EQ ID NOs: 7 o 9 y 8, CAPs_18229 definidos por el primer par de SEQ ID NOs: 12 y 13, CAPs_17563/66 definidos por el primer par de SEQ ID NOs: 10 y 11 y CAPs_ENK70 definidos por el primer par de SEQ ID NOs: 16 y 17.

- 45 En una realización, se proporciona un procedimiento en el que el rasgo deseado se selecciona de: tamaño de la fruta, forma, color, aspecto de la superficie; número de semilla, tamaño de semilla, número de lóculo; grosor y tenacidad del pericarpio; sabor, amargor, presencia de tubérculos, vida útil, vigor de la planta, forma de la hoja, longitud de la hoja, color de la hoja, altura de la planta, si la planta está determinada o no, tiempo de maduración, adaptación al crecimiento del campo, adaptación al crecimiento del invernadero, fruta calidad aceptable para el mercado y resistencia a una o más enfermedades u organismos causantes de enfermedades seleccionados del grupo que consiste en Marchitamiento por *Verticillium*, nematodos del nudo de la raíz, Virus mosaico del Tabaco, costra de Pepino, mildiu pulverulento, corinesporiosis, Virus mosaico del Pepino, marchitamiento por *Fusarium*, Virus de la mancha anular de la Papaya y el Virus mosaico Amarillo del Calabacín.

- 50 La selección de la primera progenie comprende identificar la presencia de al menos un primer marcador genético en la primera progenie que está genéticamente vinculado a un locus que contribuye a la resistencia a mildiu veloso. En una realización específica, seleccionar la primera progenie comprende además seleccionar la progenie basándose en la presencia de una pluralidad de marcadores genéticos de la segunda planta de pepino presente en la progenie.
- 55 El marcador genético se selecciona entre los marcadores CAPs_21826, CAPs_ENK60, CAPs_ENK59, CAPs_17170, CAPs_17179, CAPs_18229, CAPs_17563/66 y CAPs_ENK70. En ciertas realizaciones, el marcador genético se selecciona del grupo que consiste en CAPs_ENK60, CAPs_17170 y CAPs_17563/66.

Breve descripción de los dibujos

5 La **FIGURA 1** representa un mapa genético (izquierda) y un diagrama de LOD (derecha) para los efectos del marcador sobre la reacción al mildiu veloso en 148 familias F3 de la población de pepino L088 (Lucinde x PI197088). Las líneas entre el mapa genético y el gráfico LOD proporcionan posiciones de referencia para tres de los marcadores para ayudar en las comparaciones de la posición del mapa y la puntuación LOD.

La **FIGURA 2** representa los datos de resistencia a mildiu veloso para ciertos marcadores adicionales en una región QTL que contribuye a la resistencia a mildiu veloso identificada, mostrando la correlación entre la resistencia a DM y la posición del marcador.

Descripción detallada de la invención

10 La invención proporciona procedimientos para seleccionar plantas de pepino y en particular para producir líneas de pepino (*Cucumis sativus*) que tienen resistencia a mildiu veloso (DM). Tales líneas de pepino pueden denominarse variedades de pepino resistentes al DM. También se divulgan en el presente documento marcadores moleculares que están unidos a loci de rasgos cuantitativos que contribuyen a la resistencia al DM, e híbridos F₁ de las plantas de pepino resistentes al DM. Mediante el uso de los marcadores, un experto en la materia puede aumentar el grado de resistencia al DM en el pepino o seleccionar plantas para una mayor predisposición a la resistencia al DM. Los QTL identificados de esta manera pueden combinarse con uno o más QTL que también contribuyen a la resistencia al DM, según se desee.

20 Las plantas de pepino resistentes a DM pueden tener uno o más alelos que confieren resistencia a DM que se han introducido en los pepinos desde una línea designada como PI197088 que comprende la resistencia a DM, pero que, por lo demás, presenta características agronómicas pobres. Las plantas de pepino resistentes a DM resultantes muestran sorprendentemente rasgos agronómicos de élite en combinación con la resistencia a DM, a la vez que carecen de rasgos nocivos.

25 Las plantas de pepino resistentes al DM pueden tener hojas grandes que forman un dosel sobre la fruta. La enredadera es típicamente indeterminada y crece en enrejados o en el suelo. Las plantas de pepino resistentes al DM pueden tener hojas de color verde oscuro, verde, verde claro a amarillo y ocasionalmente amarillas a marrones. Las hojas de las plantas de pepino resistentes al DM varían en tamaño, pero típicamente son de aproximadamente 200-250 mm de largo y 150-200 mm de anchura, y generalmente son simples, alternas, palmeadas y lobuladas.

30 La fruta madura de las plantas de pepino resistentes al DM puede variar de verde claro a verde medio, o incluso verde oscuro, y típicamente el color de una fruta individual varía desde un extremo de flor de color más claro hasta un extremo de tallo de color más oscuro. El color puede estar manchado con motas amarillas. La fruta del pepino resistente al DM es típicamente alargado y cilíndrico con extremos redondeados o romos, pero también puede ser recta o curva, y generalmente tiene una longitud de 25-30 cm en la madurez de la cosecha, aunque la fruta puede ser comestible a 11-14 cm. La piel de la fruta es típicamente lisa, opaca y gruesa. La piel puede ser dura o sensible con un número variado de tubérculos. La pulpa de la fruta suele ser de color crema, con o sin rayas, y tiene un sabor amargor.

35 Como se usa en este documento, una "planta de pepino de control susceptible" se refiere a una planta de pepino susceptible a mildiu veloso (susceptible a DM) que incluye parientes silvestres y comercialmente disponibles de plantas de pepino modernas. La planta de pepino de control puede ser de la variedad MARAM, SMR58 o SPRINT 440. También se puede utilizar una "planta de pepino de control resistente" al evaluar variedades de pepino resistentes al DM. Tal control es una planta de pepino que no es susceptible al DM, pero que de otro modo es indeseable en la agricultura, por ejemplo, la variedad PI197088. De manera similar, algunos controles pueden tener resistencia intermedia, por ejemplo, los controles con resistencia intermedia a DM pueden ser DMP21, GP14, LLP-1 o POINSETT 76. Como se describe en el presente documento, una línea de pepino de control se cultiva en condiciones ambientales similares a la línea de pepino comparativa, de acuerdo con la presente divulgación.

45 Como se usa en el presente documento, una "planta de pepino híbrida" incluye una planta que resulta directa o indirectamente de cruces entre poblaciones, tipos o cultivares dentro de la especie *Cucumis sativus*. "Planta de pepino híbrida", como se usa en el presente documento, también se refiere a plantas que resultan directa o indirectamente de cruces entre diferentes variedades o genotipos.

50 Como se usa en el presente documento, un "progenitor femenino" se refiere a una planta de pepino que recibe el polen de una línea de donantes masculinos, cuyo polen poliniza con éxito un óvulo. Un progenitor femenino puede ser cualquier planta de pepino que reciba el polen. Tales progenitores femeninos pueden ser masculinos estériles, por ejemplo, debido a la esterilidad masculina génica, la esterilidad masculina citoplasmática, o porque han sido sometidos a la emasculación manual de los estambres. La esterilidad masculina genérica o citoplasmática se puede manifestar de diferentes maneras, como el polen estéril, las flores malformadas o sin estambre, la esterilidad posicional y la esterilidad funcional.

55 Como se usa en el presente documento, "esterilidad masculina citoplasmática" se refiere a plantas que generalmente no son capaces de reproducirse por autopolinización, pero sí pueden reproducirse por polinización cruzada.

Como se usa en el presente documento, "enlace" es un fenómeno en el que los alelos en el mismo cromosoma tienden a segregarse juntos más a menudo de lo esperado por casualidad si su transmisión fuera independiente.

5 Como se usa en este documento, un "marcador" es un indicador de la presencia de al menos un fenotipo, genotipo o polimorfismo. Los marcadores incluyen polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), secuencias polimórficas amplificadas escindibles (CAPS), polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLP), polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP), repeticiones de secuencia simple (SSR), inserción(es)/eliminación(es) (INDEL(s)), repeticiones de secuencias intersimples (ISSR) y secuencias de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Un marcador se hereda preferiblemente de forma codominante (ambos alelos en un locus en un heterocigoto diploide son fácilmente detectables), sin componente de variación ambiental, es *decir*, heredabilidad de 10 1. Un "marcador de ácido nucleico" como se usa en el presente documento significa una molécula de ácido nucleico que es capaz de ser un marcador para detectar un polimorfismo, fenotipo o ambos, asociados con la resistencia al DM.

15 Como se usa en el presente documento, un "rasgo deseable" o "rasgos deseables" que pueden introducirse en plantas de pepino resistentes al DM mediante reproducción pueden dirigirse a la fruta de pepino o la planta de pepino. Los rasgos deseables para ser introducidos en plantas de pepino y fruta de pepino pueden seleccionarse independientemente. Los rasgos deseables de la fruta de pepino que pueden seleccionarse independientemente incluyen: tamaño de la fruta, forma, color, apariencia de la superficie; número de semillas, tamaño de semilla, número de lóculos; grosor y tenacidad del pericarpio; sabor, amargor, presencia de tubérculos y vida útil. Los rasgos deseables de la planta de pepino que pueden seleccionarse independientemente incluyen; vigor de la planta, forma de la hoja, longitud de la hoja, color de la hoja, altura de la planta, si la planta es determinada o no, tiempo hasta la madurez, adaptación al crecimiento en campo, adaptación al crecimiento en invernadero y resistencia a una o más enfermedades u organismos causantes de enfermedades como marchitamiento por *Verticillium*, nematodos del nudo de la raíz, virus mosaico del tabaco, costra del pepino, antracnosis clase 1, mildiu pulverulento (*por ejemplo*, 20 causado por *Erysiphe cichoracearum* o *Sphaerotheca fuliginea*), corinesporiosis, virus mosaico del pepino y marchitez por *Fusarium*. Cualquier combinación de rasgos deseables de fruta de pepino, rasgos de la planta de pepino, o rasgos de plantas y frutas de pepino se pueden combinar con un rasgo de resistencia al DM.

La resistencia al DM de una planta de pepino proporcionada en este documento puede definirse potencialmente como resistencia completa o resistencia parcial. La resistencia al DM de una planta de pepino proporcionada en este documento puede medirse por cualquier medio disponible en la técnica.

30 La resistencia al DM de una planta de pepino se determina usando una clasificación de enfermedad por el desarrollo de lesiones foliares cloróticas y/o necróticas después de la inoculación o infección con DM en hojas de pepino usando una escala de síntomas de 0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % y más de aproximadamente 60 % de lesión que cubra el área de la hoja. Una calificación de enfermedad del 0 % indica una planta completamente resistente.

35 La resistencia al DM se determina obteniendo calificaciones de enfermedad por el desarrollo de síntomas después de una o más rondas de inoculación o infección con DM en las hojas y/o cotiledones del pepino. La resistencia en una prueba de hoja se puede puntuar en la escala:

Valor de Índice Síntomas

1	Ausencia de síntomas.
2	Pocas lesiones necróticas pequeñas sin expansión
3	Pocas lesiones cloróticas y algunas necróticas con expansión limitada.
4	Clorosis angular grande en expansión con lesiones necróticas limitadas
5	Clorosis angular grande en expansión con lesiones necróticas en expansión

40 Las pruebas se evalúan una vez que los síntomas se han desarrollado en controles susceptibles (*por ejemplo*, cultivares Maram o SMR58). Puede usarse PI 197088 como control "resistente"; CV. Puede usarse Poinsett 76 como control para evaluar niveles "intermedios" de resistencia/susceptibilidad a *P. cubensis*. Se hacen tres observaciones en cada parcela, una en cada extremo y otra en el medio. Se calcula el índice medio de enfermedad para cada parcela. Se promedian para las tres réplicas y se determina la desviación estándar. Luego se determinan los rangos del índice de enfermedad para las categorías "Resistente", "Resistente intermedia" y "Susceptible". Las variedades 45 generalmente se prueban varias veces antes de hacer una determinación final del nivel de resistencia a la enfermedad. Los puntajes de 1-5 indican niveles variables de resistencia o susceptibilidad. Una puntuación de 1-2

después de una o más rondas de inoculación o infección, y preferiblemente dos o más rondas de infección, indica una planta resistente. Una puntuación de 3 después de una o más rondas de inoculación o infección, preferiblemente dos o más rondas de infección, indica que una planta presenta resistencia intermedia. Un puntaje de 4-5 indica una planta susceptible. Los puntajes en esta escala 1-5 se correlacionarían con una escala 1-9 donde 1 = 1, 2 = 3, 3 = 5, 4 = 7 y 5 = 9.

En particular, una planta se analiza para determinar la resistencia, la resistencia parcial o la susceptibilidad al DM mediante análisis de imágenes de tejido foliar utilizando aproximadamente 3 hojas por planta, capturadas en una imagen digital. El análisis de imágenes se realiza para determinar el porcentaje de daño tisular y derivar una calificación de enfermedad. El software de análisis de imágenes y los procedimientos utilizados para cuantificar las diferencias visuales en dos o tres dimensiones son los establecidos en Bright, 1987 (J. Microscopy 148:51-87) y Bickmore et al., 1999 (Geol. Mat. Res. 1(5):1-19). Con respecto al análisis de imágenes: "muy resistente" presenta entre aproximadamente 0 % y 5 % de síntomas de área foliar de lesiones cloróticas y/o necróticas; "resistente" es entre aproximadamente 1 % y 20 % del área de la hoja con síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas; "sustancialmente resistente" es entre aproximadamente 20 % y 30 % del área de la hoja con síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas; "resistencia media" es entre 40 % y 50 % del área de la hoja con síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas; "parcialmente resistente" es menor o igual a aproximadamente el 50 % del área de la hoja con síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas; "susceptible media" es entre aproximadamente 50 % y 60 % del área de la hoja con síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas; y "susceptible" es entre aproximadamente 60 % y 100 % del área de la hoja con síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas. Una planta resistente puede caracterizarse por otros aspectos como se establece en el presente documento, o por el uso de otros medios, tales como PCR cuantitativa para determinar el nivel de infección.

Las líneas de pepino que tienen resistencia o resistencia parcial al DM, demuestran un nivel reducido de síntomas en relación con una línea de pepino de control no resistente después de la inoculación o infección con DM. El nivel de síntomas puede usarse como un indicador de resistencia al DM. Los síntomas de enfermedad medidos pueden ser síntomas de enfermedad asociados con la infección por DM. Los síntomas pueden seleccionarse del grupo que consiste en ampollas en las hojas, necrosis, frutas blandas, mosaico, venas cloróticas, manchas foliares cloróticas, mosaico clorótico y/o verde claro en las hojas, lesiones en frutas o combinaciones de los mismos. Una línea de pepino resistente al DM puede demostrar una reducción de los síntomas foliares de lesiones cloróticas y/o necróticas de al menos, o más de, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % en relación con una línea de pepino de control no resistente. Las hojas de una planta de pepino resistente al DM pueden mostrar menos del 15 %, o menos del 10 %, o menos del 5 %, o menos del 2 % de área sintomática cuando se exponen al DM. Además, la planta de pepino puede pertenecer a una variedad o cultivar de pepino o la planta de pepino puede ser una planta de pepino endogámica.

Las plantas y variedades de pepino proporcionadas en el presente documento demuestran pocos o ningún síntoma de lesiones cloróticas y/o necróticas después de la inoculación o infección con DM. Una planta de pepino resistente al DM puede mostrar síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas en menos del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 % 2 % o 1 % de la superficie de la hoja del pepino.

Las plantas de pepino resistentes a DM pueden exhibir un retraso en la aparición de síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas en relación con una planta de pepino de control no resistente. Las plantas de pepino resistentes al DM pueden presentar un retraso de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días en el inicio de los síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas en relación con una planta control de pepino. Las plantas de pepino resistentes a DM pueden exhibir un retraso de al menos 7 o más días, 10 o más días, o 14 o más días en el inicio de los síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas en relación con una planta de pepino de control.

La planta de pepino puede ser una plántula en el momento de la inoculación o infección. Además, la planta de pepino puede ser una plántula en la etapa de desarrollo de 4, 5, 6, 7 u 8 hojas cuando se inocula. Los síntomas de la enfermedad pueden medirse en cualquier momento después del desafío patogénico de una planta de pepino. Los síntomas pueden medirse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o más días después de la inoculación. La planta de pepino puede tener cualquier edad en el momento de la inoculación o infección.

Los síntomas de la enfermedad pueden observarse después del desafío con DM de una planta completa o una parte de la misma, por ejemplo, un corte de la planta.

Las plantas de pepino resistentes al DM pueden exhibir un aumento en el rendimiento de fruta después de la inoculación o infección con DM en relación con una planta de pepino de control inoculada con DM. Las plantas de pepino resistentes pueden exhibir un aumento del 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o más en el rendimiento de fruta, con base en la masa total, número o volumen total de fruta, en relación con una planta de pepino de control después de una o más rondas de inoculación o infección con DM.

Se divulgan plantas de pepino que exhiben resistencia a una o más tipos de DM. Las plantas de pepino pueden exhibir resistencia a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más tipos de DM.

También se divulga una semilla de una planta de pepino capaz de producir una planta que tenga resistencia al DM. La planta de pepino puede ser una variedad de polinización abierta, una línea endogámica progenitora híbrida o una

ES 2 751 104 T3

línea estéril masculina. La semilla de una planta de pepino puede ser capaz de producir una planta de pepino híbrida con resistencia al DM.

5 Las plantas de pepino pueden ser líneas de pepino adaptadas para la producción de pepino de invernadero o para la producción de pepino de campo. Las plantas de pepino pueden adaptarse para la producción de pepino de invernadero.

También se divulga un pepino híbrido que tiene resistencia al DM. Tal pepino híbrido exhibe resistencia al DM después de la inoculación o infección con DM.

10 Se seleccionan aquí plantas de pepino comercialmente valiosas. Ciertos rasgos del pepino, que incluyen, por ejemplo, el tamaño, la forma, el color, el peso, el sabor y el rendimiento de la fruta, pueden ser importantes para el valor comercial del cultivo. El tamaño y la forma de la fruta pueden ser de particular interés si los pepinos se cultivan para su procesamiento, como el encurtido. Tal planta de pepino puede producir una fruta de pepino que tiene una longitud de 11, 12, 13 o 14 cm o más, o puede producir una fruta de pepino que tiene una longitud entre 11 y 13 cm, 12 y 14 cm, y 11 y 14 cm.

15 Tal planta de pepino puede producir una fruta de pepino que tiene un peso en la cosecha de 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120 y 125 g y puede producir una fruta de pepino que tiene un peso en la cosecha entre 80 y 125 g, 90 y 115 g, 100 y 120 g, 90 y 125 g, 95 y 125 g, 100 y 125 g, o entre 115 y 125 g. El peso de la fruta se mide pesando fruta de pepino individual en una balanza.

20 La fruta de pepino maduro producido por plantas resistentes al DM puede tener un diámetro de 10, 11, 12, 13 o 14 mm o más, o el diámetro de la fruta de pepino puede ser de 10 a 11 mm, o de 10 a 12 mm, o de 11 a 13 mm, o de 12 a 14 mm, o de 13 a 14 mm.

25 Un atributo de fruta de pepino, como la forma, el peso o el tamaño, se puede medir o evaluar en una variedad de ocasiones. En particular, un atributo puede medirse después del crecimiento en una cámara de crecimiento, puede medirse en el momento de la cosecha o después del almacenamiento de la fruta de pepino en condiciones ambientales durante un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, once días, doce días, trece días, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas o cinco semanas después de la cosecha.

30 Una fruta de pepino de una planta de pepino con resistencia al DM puede tener una calificación general de calidad de fruta de 1, 3, 5, 7 o 9, donde la calidad de la fruta se mide mediante inspección visual, con una escala que varía de 1=excelente a 9=pobre: Calificación 1 = Excelente; 3 = por encima del promedio; 5 = Promedio; 7 = Por debajo del promedio; 9 = Pobre; en comparación con el híbrido comercial estándar cultivado en la zona. La calidad de la fruta se relaciona con el color, la forma, la longitud y el diámetro de la fruta.

35 También se divulgan cultivos de tejidos de las plantas de pepino descritas en este documento. Como se usa en el presente documento, el término "cultivo de tejidos" indica una composición que comprende células aisladas de uno o más tipos, o una colección de tales células organizadas en partes de una planta. El cultivo de tejidos incluye composiciones que comprenden protoplastos y callos. El cultivo de tejidos también incluye composiciones que comprenden células vegetales que están presentes en tejidos vegetales intactos, o partes de plantas, como embriones, hojas, pedúnculos, pedicelos, anteras, meristemas, puntas y segmentos de raíz, muñón y tallo y explantes. En particular, un cultivo de tejidos puede comprender embriones, protoplastos, células meristemáticas, polen, hojas, anteras o células derivadas de tejidos inmaduros de estas partes de la planta. Los medios para preparar y mantener cultivos de tejidos vegetales son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de procesos de cultivo de tejidos y regeneración de pepino se describen, por ejemplo, en Fillatti et al., 1987 (Bio/Technology, 5:726-730). En particular, el cultivo de tejidos de las plantas de pepino descritas en el presente documento se refiere al cultivo de protoplastos, callos o células vegetales, que están aisladas o presentes en partes intactas de las plantas resistentes a DM descritas en el presente documento. Además, el cultivo de tejidos puede referirse al cultivo de protoplastos, callos o células vegetales, que están aisladas o presentes en partes intactas de plantas de una o más líneas de plantas de pepino resistentes a DM seleccionadas del grupo que consiste en ASL147-2027, EUR154-1012GY, EUR154-1021GY, GSP33-1094GY, GPN33-1093GY, 03/8020-20_TUP03_DMFL_1, 03/8024-19_TUP03_DMFL_1, y 03/8039-5_TUP03_DMFL_1, y su progenie resistente a DM, incluidas las producidas por cruces o retrocruces. En otro aspecto más, el cultivo de tejidos de las plantas de pepino descritas en el presente documento se refiere al cultivo de protoplastos, callos o células vegetales, que están aisladas o presentes en partes intactas de las plantas resistentes a DM descritas en el presente documento.

55 Una vez que se producen plantas resistentes al DM, las propias plantas se pueden cultivar de acuerdo con los procedimientos convencionales. La progenie resistente a DM se puede obtener mediante reproducción sexual. Las semillas resultantes de la reproducción sexual se pueden recuperar de la fruta de plantas resistentes al DM y sembrarlas o cultivarlas como medio de propagación. La progenie resistente a DM también puede obtenerse de plantas resistentes a DM a través de reproducción asexual. Los protoplastos o propágulos (por ejemplo, esquejes, tallos o rizomas) pueden recuperarse de plantas resistentes a DM o partes de las mismas y pueden emplearse para propagar plantas resistentes a DM.

- También se divulgan contenedores de semillas de pepino en los que las plantas de pepino cultivadas a partir de más del 50 % de las semillas tienen resistencia o resistencia parcial al DM. Las plantas de pepino cultivadas a partir de más del 55 %, 65 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las semillas de pepino en el contenedor pueden tener resistencia al DM. Además, se divulgan semillas de una planta de pepino seleccionada del grupo que consiste en todas las líneas depositadas como se mencionó anteriormente, y su progenie resistente al DM, en la que las plantas de pepino cultivadas de aproximadamente el 50 %, o más del 50 %, de las semillas tienen resistencia o resistencia parcial al DM.
- El contenedor de semillas de pepino puede contener cualquier número, peso o volumen de semillas. Por ejemplo, un contenedor puede contener aproximadamente, o más de aproximadamente, 10, 25, 50, 200, 400, 700, 1000, 2000, 3000 o más semillas. Además, un contenedor puede contener o más de 1 g, 5, 10, 15, 25, 100, 250, 500 o 1000 g de semillas. Alternativamente, el recipiente puede contener o al menos, o más de, aproximadamente 28 g (1 onza), 57, 113, 227, 283 g (2, 4, 8, 10 onzas), 0,45 kg (1 libra), 0,91, 1,81, 3,62, 5,44 kg (2, 4, 8, 12 libras) o más de semillas.
- Los contenedores de semillas de pepino pueden ser cualquier contenedor disponible en la técnica. Por ejemplo, un contenedor puede ser una caja, una bolsa, un paquete, un saco, un rollo de cinta, una hoja, un cubo o un tubo.
- También se divulga un recipiente de fruta de pepino de plantas de pepino que tiene resistencia al DM. El contenedor puede contener aproximadamente 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100 o más frutas de pepino. También se divulga una enredadera de pepino que tiene fruta de pepino de una planta que tiene resistencia al DM.
- También se divulgan frutas de pepinos secos o procesados de otro modo, producidos por una planta de pepino que tiene un genoma que comprende al menos un locus genético que da lugar a la resistencia al DM cuando se expresa en una planta de pepino. La fruta de pepino procesada incluye pulpa de fruta, pepinos cocidos, fruta de pepino en lata, encurtida, picada, en rodajas o triturada. La fruta de pepino seca, encurtida o procesada de otro modo puede ser la fruta de una planta de pepino seleccionada de uno o más del grupo que consiste en todas las líneas depositadas como se mencionó anteriormente, y la progenie resistente a DM de la misma.
- También se divulga una planta de pepino endogámica que tiene resistencia a DM, en la que la resistencia se exhibe cuando la planta está en contacto con DM. La planta de pepino endogámica puede derivarse del acceso PI197088.
- También se divulgan plantas de *C. sativus* que tienen al menos un alelo para un rasgo de resistencia a DM. Las plantas de pepino resistentes a DM pueden ser heterocigotas u homocigotas para el rasgo de resistencia a DM. El rasgo resistente a DM puede estar relacionado con variaciones en un solo gen (*por ejemplo*, unido a uno o más alelos de un solo gen), o puede estar relacionado con variaciones en uno o uno o más loci de rasgos cuantitativos (QTL). Además, las plantas de pepino resistentes a DM pueden ser homocigotas para el rasgo de resistencia a DM.
- También se divulga una planta de pepino *C. sativus* que tiene un genoma que comprende al menos un locus genético que proporciona resistencia al DM de una planta que no es *C. sativus*. La planta de pepino resistente a DM puede seleccionarse del grupo que consiste en todas las líneas depositadas como se mencionó anteriormente, y la progenie resistente a DM de la misma. El locus genético derivado de una planta de pepino resistente al DM puede identificarse utilizando marcadores genéticos.
- También se divulga una planta de pepino *C. sativus* resistente al DM que tiene menos o igual al 50 % de su genoma derivado de una planta *C. sativus* no resistente a DM. Alternativamente, una planta de pepino *C. sativus* resistente a DM puede tener un 50 %, 25 %, 12,5 %, 6 %, 3 % o menos ADN del núcleo derivado de un DM no resistente a planta *C. sativus*. En particular, dicha planta de pepino *C. sativus* resistente a DM puede tener 50 %, 25 %, 12,5 %, 6 % o 3 % o menos de ADN del núcleo derivado de otro miembro del género *Cucumis* que sea resistente a DM.
- También se divulga la progenie de plantas de pepino que tienen resistencia al DM. La progenie incluye no solo los productos de cualquier cruce (ya sea un retrocruce o no) entre dos plantas, sino toda la progenie cuyo pedigrí se remonta al cruce original. La progenie puede contener aproximadamente 50 %, 25 %, 12,5 % o menos de ADN del núcleo de una planta de pepino resistente al DM y expresa el material genético que proporciona resistencia al DM.
- También se divulga una planta de pepino resistente al DM que contiene un marcador genético vinculado a uno o más loci de resistencia al DM. Por "locus de resistencia a DM" se entiende un locus que contribuye a la resistencia a DM ya sea solo o en combinación con otro locus más de resistencia a DM. Por "contribuye a la resistencia a mildiu veloso" se entiende que el grado de resistencia a mildiu veloso aumenta en la planta correspondiente, ya sea cuando el locus está solo o en combinación con uno o más loci.
- Un marcador vinculado a uno o más loci de resistencia a DM incluye uno o más de los siguientes: CAPs_21826, CAPs_ENK60, CAPs_ENK59, CAPs_17170, CAPs_17179, CAPs_18229, CAPs_17563/66 y CAPs_ENK70. En particular, los marcadores analizados vinculados a uno o más loci de resistencia al DM incluyen cada uno de los siguientes: CAPs_ENK60, CAPs_17170 y CAPs_17563/66.
- Como se usa en el presente documento, el enlace de dos secuencias de ácido nucleico, que incluyen una secuencia marcadora de ácido nucleico y una secuencia de ácido nucleico de un locus genético que imparte un rasgo deseado tal como resistencia a DM, puede ser genético o físico o ambos. El marcador de ácido nucleico y el locus genético que confieren resistencia al DM pueden estar unidos genéticamente, y pueden exhibir una puntuación LOD de más

de 2,0, como se juzga por el mapeo de intervalos para el rasgo de resistencia al DM con base en los procedimientos de máxima probabilidad descritos por Lander y Botstein, 1989 (Genetics, 121:185-199), e implementado en el paquete de software MAPMAKER (*por ejemplo*, Lander et al., Genomics 1:174-181, (1987); parámetros predeterminados). El marcador y la región que confieren resistencia al DM pueden estar unidos genéticamente y pueden exhibir un puntaje LOD mayor a 3,0, o un puntaje LOD mayor a 6,0, 9,0, 12,0, 15,0 o 18,0. En particular, el marcador y la región que contribuyen a la resistencia al DM pueden estar unidos genéticamente y pueden presentar una puntuación LOD de entre 14 y 20.

El marcador de ácido nucleico puede estar genéticamente unido a una distancia de entre 0 y 50 centimorgans (cM) al locus de resistencia a DM, o la distancia entre el marcador de ácido nucleico y el locus de resistencia a DM puede estar entre 0 y 35 cM, o entre 0 y 25 cM, o entre 0 y 15 cM, o entre 0 y 10 cM, o entre 0 y 5 cM, incluyendo menos de 4, 3, 2 o 1 cM.

La molécula de ácido nucleico puede estar físicamente unida a un locus de resistencia a DM. El marcador de ácido nucleico se hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que está dentro de 30 Mbp, o 20 Mbp, o 15 Mbp, o 10 Mbp, o 5 Mbp de un locus de resistencia a DM.

Como se usa en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridarse entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico de doble cadena antiparalela. Las condiciones de restricción convencionales están descritas por Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) y por Haymes et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985). Por lo tanto, se permiten desviaciones de la complementariedad completa, siempre que tales desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Por lo tanto, para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo necesita tener una secuencia suficientemente complementaria para poder formar una estructura bicatenaria estable bajo el disolvente particular y las concentraciones de sal empleadas.

Condiciones de restricción apropiadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, 6,0 X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de un lavado de 2,0 X SSC a 50°C, son conocidas por los expertos en la materia o pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Las condiciones de hibridación pueden ser condiciones de restricción alta, moderada o baja. Las condiciones preferidas incluyen aquellas que usan 50 % de formamida, 5,0 X SSC, 1 % de SDS e incubación a 42°C durante 14 horas, seguido de un lavado con 0,2 X SSC, 1 % de SDS e incubación a 65°C.

La especificidad de la hibridación puede verse afectada por los lavados posteriores a la hibridación. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar de una restricción baja de aproximadamente 2,0 X SSC a 50°C a una restricción moderada de aproximadamente 1,0 X SSC a 50°C a una restricción alta de aproximadamente 0,2 X SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar de condiciones de baja restricción a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, a condiciones de restricción moderada a aproximadamente 50°C, a condiciones de alta restricción a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la concentración de sal pueden variar, o bien la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En algunos aspectos, el paso de lavado se puede realizar durante 5, 10, 15, 20, 25, 30 o más min. En particular, la etapa de lavado se puede realizar durante 20 min. Además, la etapa de lavado puede repetirse 1, 2, 3, 4 o más veces usando la concentración de sal, temperatura y tiempo seleccionados. En particular, la etapa de lavado se repite dos veces.

Un perfil de marcador genético de una planta puede ser predictivo de los rasgos agronómicos de un híbrido producido usando esa endogamia. Por ejemplo, si una planta endogámica de perfil y fenotipo de marcador genético conocido se cruza con una segunda endogamia de perfil y fenotipo de marcador genético conocido, es posible predecir el fenotipo del híbrido F₁ basándose en los perfiles de marcador genético combinados de los endogámicos parentales. Los procedimientos para predecir el rendimiento híbrido a partir de datos de marcadores genéticos se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,492,547. Dichas predicciones pueden hacerse usando cualquier marcador genético adecuado, por ejemplo, SSR, INDEL, RFLP, AFLP, SNP, ISSR o isoenzimas.

Se pueden utilizar marcadores adicionales, como SSR, marcadores AFLP, marcadores RFLP, marcadores RAPD, marcadores fenotípicos, SNP, marcadores isozimáticos o perfiles de transcripción de microarreglos que están genéticamente vinculados o correlacionados con la resistencia al DM (Walton, Seed World 22-29 (July, 1993); Burow and Blake, Molecular Dissection of Complex Traits, 13-29, Eds. Paterson, CRC Press, New York (1988)). Los procedimientos para aislar tales marcadores son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los SSR específicos de locus pueden obtenerse cribando una biblioteca genómica de pepino para SSR, secuenciando clones "positivos", diseñando cebadores que flanquean las repeticiones y amplificando el ADN genómico con estos cebadores.

El enlace genético de las moléculas marcadoras con la resistencia al DM se puede establecer mediante un modelo de mapeo de genes como, sin limitación, el modelo de marcador de flanqueo y el mapeo de intervalos, con base en los procedimientos de máxima verosimilitud descritos por Lander y Botstein, 1989 (Genetics, 121:185-199), e implementado en el paquete de software MAPMAKER.

Se calcula una estimación de máxima verosimilitud (MLE) para la presencia de un marcador, junto con un MLE que no asume ningún efecto de rasgo, para evitar falsos positivos. Luego se calcula un \log_{10} de una relación de probabilidades (LOD) como: $LOD = \log_{10} (\text{MLE para la presencia de un rasgo (MLE dado que no hay rasgo vinculado)})$.

5 El puntaje LOD esencialmente indica cuánto más probable es que los datos hayan surgido suponiendo la presencia de un alelo de resistencia en lugar de su ausencia. El valor umbral de LOD para evitar un falso positivo con una confianza dada, sea por caso, 95 %, depende del número de marcadores y la longitud del genoma. Los gráficos que indican los umbrales de LD son establecidos en Lander and Botstein (1989), y Ars and Moreno-Gonzalez, Plant Breeding, Hayward, Bosemark, Romagosa (eds.) Chapman & Hall, London, pp. 314-331 (1993).

10 La selección de poblaciones de mapeo o segregación apropiadas es importante en el mapeo de rasgos. La elección de la población de mapeo apropiada depende del tipo de sistema marcador utilizado (Tanksley et al., Molecular mapping plant chromosomes. Chromosome structure and function: Impact of new concepts J. P. Gustafson and R. Appels (eds.), Plenum Press, New York, pp. 157-173 (1988)). Se debe considerar la fuente de los progenitores (adaptados frente a exóticos) utilizados en la población cartográfica. El emparejamiento de cromosomas y las tasas de recombinación pueden ser severamente alteradas (suprimidas) en cruces amplios (adaptados x exóticos) y generalmente producen distancias de enlace muy reducidas. Los cruces amplios generalmente proporcionarán poblaciones segregantes con una variedad relativamente grande de polimorfismos en comparación con la progenie en un cruce estrecho (adaptado x adaptado).

20 Como se usa en este documento, la progenie incluye no solo los productos de cualquier cruce (ya sea un retrocruce o de otro tipo) entre dos plantas, sino toda la progenie cuyo pedigrí se remonta al cruce original. Específicamente, sin limitación, dicha progenie incluye plantas que tienen 50 %, 25 %, 12,5 % o menos de ADN del núcleo derivado de una de las dos plantas cruzadas originalmente. Como se usa en el presente documento, una segunda planta se deriva de una primera planta si el pedigrí de la segunda planta incluye la primera planta.

25 También se divulga un complemento genético de las líneas de pepino descritas aquí. Además se divulga un complemento genético híbrido, en el que el complemento está formado por la combinación de un complemento genético haploide de las líneas de pepino endogámicas de élite descritas en este documento y otro complemento genético haploide. Los medios para determinar dicho complemento genético son bien conocidos en la técnica.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "complemento genético" significa un agregado de secuencias de nucleótidos, expresión que define el fenotipo de una planta, tal como una planta de pepino *C. sativus* o una célula o tejido de esa planta. A modo de ejemplo, una planta de pepino *C. sativus* se genotipifica para determinar una muestra representativa de los marcadores heredados que posee. Los marcadores se heredan preferiblemente de forma codominante, de modo que la presencia de ambos alelos en un locus diploide es fácilmente detectable y están libres de variación ambiental, es decir, su heredabilidad es cercana o igual a 1. Este genotipo se realiza preferiblemente en al menos una generación de la planta descendiente para la cual también se determina el valor numérico del rasgo o rasgos de interés. El conjunto de genotipos de locus individuales se expresa como un perfil de alelos marcadores, dos en cada locus para una planta diploide. La composición alélica del marcador de cada locus puede ser homocigota o heterocigota. La homocigosidad es una condición en la que ambos alelos en un locus se caracterizan por las mismas condiciones del genoma en un locus (*por ejemplo*, la misma secuencia de nucleótidos). La heterocigosidad se refiere a diferentes condiciones del genoma en un locus. Potencialmente, se podría usar cualquier tipo de marcador genético, por ejemplo, repeticiones de secuencia simple (SSR), polimorfismo de inserción/eliminación (INDEL), polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP), polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLP), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) e isozimas.

40 Se puede obtener información genética considerable de una población F_2 completamente clasificada utilizando un sistema marcador codominante (Mather, Measurement of Linkage in Heredity: Methuen and Co., (1938)). Una población F_2 es la primera generación de polinización propia o entre hermanos después de que se produce la semilla híbrida. Por lo general, una sola planta F_1 se poliniza por sí misma o con parentesco para generar una población que es segregada por los genes codificados nucleares de forma Mendeliana (1:2:1).

50 En contraste con el uso de marcadores codominantes, el uso de marcadores dominantes a menudo requiere pruebas de progenie (*por ejemplo*, F_3 o familias cruzadas) para identificar individuos heterocigotos. La información recopilada puede ser equivalente a la obtenida en una población F_2 completamente clasificada. Sin embargo, este procedimiento a menudo es prohibitivo debido al coste y al tiempo involucrados en las pruebas de progenie. Las pruebas de progenie de individuos F_2 a menudo se usan en la construcción de mapas donde el error está asociado con el fenotipo de una sola planta, o cuando el muestreo de las plantas para el genotipo afecta la capacidad de realizar un fenotipo preciso, o donde la expresión del rasgo está controlada por un QTL. Los datos de segregación de poblaciones de prueba de progenie (*por ejemplo*, F_3 o familias retrocruzadas o no mezcladas) se pueden usar en el mapeo de rasgos. La selección asistida por marcadores se puede aplicar a la progenie posterior con base en asociaciones de mapa de rasgos de marcador (F_2 , F_3), donde el enlace no ha sido completamente disociado por eventos de recombinación (*es decir*, desequilibrio máximo).

60 Las líneas endogámicas recombinantes (RIL) (líneas genéticamente relacionadas; generalmente $> F_5$) pueden usarse como una población de mapeo. Los RIL pueden desarrollarse autofecundando plantas F_2 , luego autopolinizando las

plantas F3 resultantes y repitiendo este proceso generacional sin mezcla, aumentando así la homocigosidad. La información obtenida de los marcadores dominantes se puede maximizar mediante el uso de RIL porque todos los loci son homocigotos o casi. En condiciones de enlace estrecho (*es decir*, aproximadamente <10 % de recombinación), los marcadores dominantes y codominantes evaluados en poblaciones RIL proporcionan más información por individuo que cualquier tipo de marcador en poblaciones de retrocruce (*por ejemplo*, Reiter et al., 1992; Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:1477-1481). Sin embargo, a medida que la distancia entre los marcadores se hace mayor (*es decir*, los loci se vuelven más independientes), la información en las poblaciones de RIL disminuye dramáticamente en comparación con los marcadores codominantes.

Las poblaciones de retrocruce pueden utilizarse como poblaciones de mapeo. Se puede crear una población de retrocruce (BC) cruzando una F₁ a uno de sus progenitores. Por lo general, las poblaciones de retrocruce se crean para recuperar los rasgos deseables (que pueden incluir la mayoría de los genes) de uno de los progenitores recurrentes (el progenitor que se emplea en los retrocruces) mientras se agregan uno o algunos rasgos del segundo progenitor, que es a menudo referido como el donante. Se puede hacer una serie de retrocruces con el progenitor recurrente para recuperar la mayoría de los rasgos deseables del progenitor recurrente. Por lo tanto, se crea una población que consiste en individuos casi como el progenitor recurrente, en el que cada individuo lleva cantidades variables o un mosaico de regiones genómicas del progenitor donante. Las poblaciones de retrocruce pueden ser útiles para mapear marcadores dominantes, particularmente si todos los loci en el progenitor recurrente son homocigotos y el donante y el progenitor recurrente tienen alelos marcadores polimórficos contrastantes (Reiter et al., 1992; Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:1477-1481).

La información obtenida de las poblaciones de retrocruce que utilizan marcadores codominantes o dominantes es menor que la obtenida de las poblaciones F₂ completamente clasificadas porque los eventos de recombinación que involucran uno, en lugar de dos, gametos se muestrean por planta. Sin embargo, las poblaciones de retrocruce son más informativas (a baja saturación de marcadores) en comparación con las RIL, ya que la distancia entre los loci unidos aumenta en las poblaciones de RIL (*es decir*, aproximadamente el 15 % de recombinación). El aumento de la recombinación puede ser beneficioso para la resolución de enlaces estrechos, pero puede ser indeseable en la construcción de mapas con baja saturación de marcadores.

Las líneas casi isogénicas (NIL) creadas por muchos retrocruces para producir una variedad de individuos que son casi idénticos en composición genética, excepto por el rasgo o la región genómica bajo interrogación, pueden usarse como una población de mapeo. Al mapear con NIL, solo se espera que una parte de los loci polimórficos entre los progenitores se segregue en la población NIL altamente homocigota. Sin embargo, es probable que los loci que son polimórficos en una población NIL estén vinculados al rasgo de interés.

El análisis segregante masivo (BSA) es un procedimiento desarrollado para la identificación rápida de vínculos entre marcadores y rasgos de interés (Michelmore, et al., 1991; Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9828-9832). En BSA, se extraen dos muestras de ADN masivas de una población segregante que se origina en un solo cruce. Estas muestras masivas contienen individuos que son idénticos para un rasgo particular (*por ejemplo*, resistente o susceptible a un patógeno particular) o región genómica pero arbitrarios en regiones no unidas (*es decir*, heterocigotos). Las regiones desvinculadas del rasgo objetivo no diferirán entre las muestras agrupadas de muchos individuos en BSA.

También se divulga un procedimiento para producir una planta de pepino resistente a DM que comprende: (a) cruzar una línea de pepino que tiene resistencia a DM con una segunda línea de pepino que carece de resistencia a DM para formar una población segregante; (b) cribar la población en cuanto a resistencia a DM; y (c) seleccionar uno o más miembros de la población con dicha resistencia al DM. En particular, la línea de pepino que tiene resistencia a DM se cruza con la segunda línea de pepino durante al menos dos generaciones (*por ejemplo*, creando una población F₂ o BC₁S₁). Además, las plantas pueden identificarse como resistentes al DM antes del cruce. Además, las plantas pueden seleccionarse en función de la resistencia parcial o completa al DM. La población segregante puede autocruzarse y la población subsiguiente puede cribarse por resistencia.

También se divulga un procedimiento de introgresión de la resistencia al DM en una planta de pepino que comprende: (a) cruzar al menos una primera línea de pepino que tiene resistencia al DM con una segunda línea de pepino para formar una población segregante; (b) cribar dicha población en cuanto a resistencia al DM; y (c) seleccionar al menos un miembro de dicha población que exhibe resistencia a DM. La línea de pepino que tiene resistencia a DM puede cruzarse con la segunda línea de pepino durante al menos dos generaciones (*por ejemplo*, creando una población F₂ o BC₁S₁). Además, las plantas pueden identificarse como resistentes al DM antes del cruce. En particular, la población segregante puede cruzarse por sí misma y la población subsiguiente puede someterse a cribado por resistencia.

Las plantas de pepino generadas usando un procedimiento como se divulga en el presente documento pueden formar parte o generarse a partir de un programa de mejoramiento. La elección del procedimiento de reproducción depende del modo de reproducción de la planta, la heredabilidad de los rasgos que se mejoran y el tipo de cultivar utilizado comercialmente (*por ejemplo*, cultivar híbrido F₁, cultivar de línea pura, etc.). A continuación se exponen las metodologías seleccionadas para la reproducción de las plantas de la presente invención. Se puede mejorar un programa de reproducción utilizando la selección asistida por marcadores de la progenie de cualquier cruce. Se entiende además que cualquier cultivar comercial y no comercial puede utilizarse en un programa de mejoramiento.

Factores como, por ejemplo, el vigor de emergencia, el vigor vegetativo, la tolerancia al estrés, la resistencia a las enfermedades, la ramificación, la floración, el tamaño de la fruta, la calidad de la fruta y/o el rendimiento de la fruta determinarán generalmente la elección.

5 Para los rasgos altamente heredables, una elección de plantas individuales superiores evaluadas en una sola ubicación será efectiva, mientras que para los rasgos con baja heredabilidad, la selección debe basarse en análisis estadísticos (*por ejemplo*, valores medios) obtenidos de evaluaciones replicadas de familias de plantas relacionadas. Los procedimientos de selección populares comúnmente incluyen selección de pedigrí, selección de pedigrí modificada, selección masiva y selección recurrente. En particular, se realiza un programa de retrocruce o reproducción recurrente.

10 La complejidad de la herencia influye en la elección del procedimiento de reproducción. El mejoramiento por retrocruce puede usarse para transferir uno o unos pocos genes favorables para un rasgo altamente heredable a un cultivar deseable. Esta metodología se ha utilizado ampliamente para cultivar cultivares resistentes a enfermedades. Se utilizan diversas técnicas de selección recurrente para mejorar los rasgos heredados cuantitativamente controlados por numerosos genes. El uso de la selección recurrente en cultivos autopolinizantes depende de la
15 facilidad de la polinización, la frecuencia de híbridos exitosos de cada polinización y el número de descendientes híbridos de cada cruce exitoso.

Las líneas de reproducción se pueden probar y comparar con los estándares apropiados en entornos representativos del área o áreas objetivo comerciales durante dos o más generaciones. Las mejores líneas son candidatos como progenitores para nuevos cultivares comerciales; los que aún tienen deficiencias en los rasgos
20 pueden ser utilizados como progenitores para híbridos, o para producir nuevas poblaciones para una posterior selección.

Un procedimiento para identificar una planta superior es observar su rendimiento en relación con otras plantas experimentales y con un cultivar estándar ampliamente cultivado. Si una sola observación no es concluyente, las observaciones replicadas pueden proporcionar una mejor estimación de su valor genético. Un productor puede
25 seleccionar y cruzar dos o más líneas parentales, seguido de una polinización repetida y autoselección o entre hermanos, produciendo muchas combinaciones genéticas nuevas.

El desarrollo de nuevas líneas de pepino requiere el desarrollo y la selección de variedades de pepino, el cruce de estas variedades y la selección de cruces híbridos superiores. La semilla híbrida se puede producir mediante cruces manuales entre progenitores masculinos con fertilidad seleccionados o mediante el uso de sistemas de esterilidad masculina. Los híbridos se pueden seleccionar para ciertos rasgos de un solo gen, como el color de la flor, el
30 rendimiento de la semilla o la resistencia a los herbicidas que indican que la semilla es realmente un híbrido. Los datos adicionales sobre las líneas parentales, así como el fenotipo del híbrido, influyen en la decisión del obtentor de continuar con el cruce híbrido específico.

Se pueden utilizar procedimientos de reproducción de pedigrí y selección recurrente para desarrollar cultivares a partir de poblaciones reproductoras. Los programas de mejoramiento combinan rasgos deseables de dos o más cultivares o varias fuentes de base amplia en conjuntos de mejoramiento a partir de los cuales los cultivares se desarrollan por sí mismos y la selección de los fenotipos deseados en líneas parentales. Estas líneas se utilizan para producir nuevos cultivares. Se pueden evaluar nuevos cultivares para determinar cuáles tienen potencial comercial.
35

La reproducción de pedigrí se usa comúnmente para la mejora de cultivos autopolinizantes. Dos progenitores que poseen rasgos favorables y complementarios se cruzan para producir un F_1 . Una población F_2 es producida por uno o varios F_1 . Se realiza la selección de los mejores individuos en las mejores familias. Las pruebas replicadas de familias pueden comenzar en la generación F_4 para mejorar la efectividad de la selección de rasgos con baja heredabilidad. En una etapa avanzada de endogamia (*es decir*, F_6 y F_7), las mejores líneas o mezclas de líneas fenotípicamente similares se prueban para su posible liberación como nuevos cultivares.
40

La reproducción por retrocruce y la reproducción cruce se han utilizado para transferir genes de un rasgo simplemente heredado y altamente heredable a un cultivar homocigoto o línea endogámica deseable, que es el progenitor recurrente. La fuente del rasgo que se va a transferir se llama progenitor donante. Se espera que la planta resultante obtenida de un exitoso programa de retrocruce tenga los atributos del progenitor recurrente (*por ejemplo*, cultivar) y el rasgo deseable transferido del progenitor donante. Después del cruce inicial, los individuos que poseen el fenotipo del progenitor donante se seleccionan y se cruzan (retrocruzan) repetidamente con el progenitor recurrente. Después de varias generaciones de retrocruce con selección, se espera que la línea resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (*por ejemplo*, cultivar) y el rasgo deseable transferido del progenitor donante.
50

La reproducción por cruce o la reproducción por retrocruce de una planta de pepino resistente a DM puede realizarse cuando el otro progenitor (segunda planta de pepino) sea resistente a DM o el otro progenitor no sea resistente a DM.
55

Las plantas de pepino generadas pueden generarse usando un procedimiento de descenso de una sola semilla. El procedimiento de descenso de una sola semilla, en sentido estricto, se refiere a plantar una población segregante, luego seleccionar una planta en esta y en cada generación posterior para crear y crear la próxima generación.

5 Cuando la población ha avanzado de la F₂ al nivel deseado de endogamia, las plantas de las que se derivan las líneas se rastrearán a diferentes individuos F₂. El número de plantas en una población disminuye cada generación debido a que algunas semillas no germinan o algunas plantas producen al menos una semilla. Como resultado, no todas las plantas F₂ muestreadas originalmente en la población estarán representadas por una progenie cuando se complete el avance de generación.

Se pueden encontrar descripciones de otros procedimientos de reproducción que se usan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos en uno de varios libros de referencia disponibles (*por ejemplo*, Fehr, Principles of Cultivar Development Vol. 1, pp. 2-3 (1987)).

10 La fuente del rasgo de resistencia al DM para usar en un programa de reproducción puede derivarse de una planta seleccionada del grupo que consiste en ASL147-2027, EUR154-1012GY, EUR154-1021GY, GSP33-1094GY, GPN33-1093GY, 03/8020-20_TUP03_DMFL_1, 03/8024-19_TUP03_DMFL_1, y 03/8039-5_TUP03_DMFL1, y su progenie resistente a DM, o la fuente del rasgo de resistencia a DM para usar en un programa de reproducción no puede derivarse de una planta seleccionada del grupo que consiste en ASL147-2027, EUR154-1012GY, EUR154-1021GY, GSP33-1094GY, GPN33-1093GY, 03/8020-20_TUP03_DMFL_1, 03/8024-19_TUP03_DMFL1, y 03/8039-5_TUP03_DMFL1, y la progenie resistente a DM de los mismos.

20 También se divulga una planta de pepino endogámica que tiene resistencia al DM, en la que dicha resistencia se exhibe cuando dicha planta está en contacto con dicha DM, y en la que dicha planta de pepino no se deriva de una planta seleccionada del grupo que consiste en ASL147-2027, EUR154-1012GY, EUR154-1021GY, GSP33-1094GY, GPN33-1093GY, 03/8020-20_TUP03_DMFL_1, 03/8024-19_TUP03_DMFL_1, y 03/8039-5_TUP03_DMFL_1. También se divulga una planta de pepino que tiene un genoma, en el que dicho genoma comprende un locus genético que confiere resistencia al DM, en el que dicho locus genético contiene uno o más marcadores genéticos vinculados a dicho locus genético que confiere resistencia al DM, y en el que dicha planta de pepino no es el acceso PI197088.

25 Se pueden identificar fuentes adicionales de resistencia al DM para su uso en un programa de mejoramiento genético mediante el cribado del germoplasma de pepino para determinar la resistencia al DM. En particular, pueden cribarse plantas de pepino para determinar la resistencia al DM identificando germoplasma que presente síntomas de enfermedad reducidos en relación con una planta de pepino de control después de la inoculación o infección. Las plantas de pepino pueden cribarse para determinar la resistencia al DM usando una criba de enfermedad tal como un campo o criba de invernadero como se describe en el Ejemplo 1 o el Ejemplo 2.

30 Se pueden identificar fuentes adicionales de resistencia al DM para su uso en un programa de mejoramiento genético mediante el cribado con uno o más marcadores moleculares vinculados a un locus genético que confiere resistencia al DM, como los identificados aquí.

35 Pueden identificarse fuentes adicionales de resistencia al DM para su uso en un programa de mejoramiento genético mediante una combinación de cribado de plantas de pepino para detectar síntomas de enfermedad reducidos y luego cribado con uno o más marcadores moleculares vinculados a un locus genético que contribuye a la resistencia al DM.

40 Las líneas de pepino con resistencia al DM pueden usarse en programas de mejoramiento para combinar la resistencia al DM con rasgos adicionales de interés. Dicha resistencia al DM puede combinarse con cualquier rasgo adicional, incluidos los rasgos resistentes a enfermedades, los rasgos de rendimiento y los rasgos de calidad de la fruta. Por ejemplo, los programas de mejoramiento pueden usarse para combinar el rasgo de resistencia al DM con alelos que contribuyen al tamaño y la forma de la fruta de pepino. También se pueden usar programas de reproducción para combinar la resistencia al DM con uno o más rasgos resistentes a la enfermedad. Dichos rasgos resistentes a la enfermedad incluyen, sin limitación, resistencia a: marchitez por *Verticillium*, nematodos del nudo de la raíz, virus mosaico del tabaco, costra de pepino, mildiu pulverulento, corinesporiosis, virus mosaico del pepino y marchitamiento por *Fusarium*. Los rasgos que se combinan pueden ser coheredados conjuntamente en cruces posteriores.

50 También se divulgan partes de las plantas de pepino resistentes a DM producidas por un procedimiento descrito en este documento. Las partes de las plantas de pepino incluyen células vegetales o partes de células vegetales, semillas, endospermo, meristemo, flores, anteras, óvulos, polen, frutas, flores, tallos, raíces, tallos u hojas, tallos y raíces. Las partes de las plantas también incluyen las partes de una fruta de pepino, que incluyen la placenta, la columela y el pericarpio. En particular, la parte de la planta es una semilla.

55 También se divulgan partes de una planta de pepino que tiene un genoma, que comprende al menos un locus genético que da lugar a la resistencia al DM en la planta de pepino. Las partes de las plantas de pepino pueden derivarse de una planta de pepino seleccionada del grupo que consiste en todas las líneas depositadas y la progenie resistente al DM de las mismas. Las características fisiológicas y morfológicas de las líneas depositadas ASL147-2027, EUR154-1012GY, EUR154-1021GY, GSP33-1094GY, GPN33-1093GY, 03/8020-20_TUP03_DMFL_1, 03/8024-19_TUP03_DMFL_1, y 03/8039-5_TUP03_DMFL_1 se establecen en las Tablas 1-8 a continuación.

ES 2 751 104 T3

Tabla 1: Características Fisiológicas y Morfológicas de la Línea ASL147-2027 Mo.

	CARACTERÍSTICA	ASL147-2027
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Rebanar
	Cultivo predominante	Al aire libre
	Área de Mejor Adaptación en Estados Unidos	La mayoría de las áreas
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	50-55
3.	Planta	
	Forma predominante	Enredadera
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Monoico
	Color de la Flor	Amarillo
4.	Fruta en Madurez Comestible	
	Forma del cuello de la fruta	Sin Cuello
	Aguzamiento de fruta	Extremo romo o redondeado
	Espesor de la piel	Grueso
	Nervaduras de la piel	Acanalada
	Dureza de la piel	Difícil
	Lustre de la piel	Opaco
	Color de espina	Blanco
	Calidad de espina	Grueso
	Densidad de espina	Pocas
	Sabor	Sin amargor
5.	Resistencia a insectos	
	Áfidos (<i>Aphisgossypii</i>)	Susceptible

Tabla 2: Características fisiológicas y morfológicas de la línea EUR154-1012 GY.

	CARACTERÍSTICA	EUR 154-1012 GY
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Fresco
	Cultivo predominante	Invernadero
	Área de Mejor Adaptación en Estados Unidos	España
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65

ES 2 751 104 T3

3.	Planta	
	Forma predominante	Enredadera
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Ginoico
	Color de la flor	Amarillo
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Longitud del internodo	5-8 cm
	Forma de tallo	Acanalada
5.	Fruta en madurez comestible	
	Longitud	30-32 cm
	Diámetro en la media	45-50 mm
	Peso	300-400 g
	Color de Piel	Verde medio
	Tiras terminales de flor amarillentas	No
	Color predominante en el extremo del tallo	Verde uniforme
	Color predominante en el extremo de la flor	Verde uniforme
	Forma del cuello de la fruta	Medio
	Aguzamiento de fruta	Redondeado
	Sección transversal del extremo del tallo	rd
	Sección transversal en la media	rd
	Sección transversal del extremo de flor	rd
	Espesor de la piel	Delgado
	Nervaduras de la piel	Acanalada
	Dureza de la piel	Baja
	Lustre de la piel	Brillante
	Color de espina	Blanco
	Calidad de espina	Fina
	Densidad de espina	Muy bajo
	Tubérculos (Verrugas)	No
	Sabor	Sin amargor
6.	Fruta en la madurez de cosecha	
	Longitud	35-37 cm
	Diámetro en la media	50-60 mm

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	EUR 154-1012 GY
	Color	Amarillo
	Patrón de color	A rayas
	Superficie	Suave
	Enmallado	Ligero o ninguno
	Conjunto de frutas	Normalmente sin semillas
7.	Semillas	
	Nº por fruta	30-80
	Por 1000 semillas	30-35 g
8.	Resistencia a las enfermedades	
	Costra de pepino (Gumosis) (<i>Cladosporiumcucumerinum</i>)	
	Mildiu veloso	Resistente
	Mildiu pulverulento (<i>Erysiphecichoracearum</i>)	Resistente
	Virus mosaico del pepino	Susceptible
	Virus de amarilleamiento de venas de pepino	Susceptible
	Virus del trastorno de atrofia amarilla del pepino	Resistencia intermedia
9.	Resistencia a insectos	
	Áfido (<i>Aphis gossypii</i>)	Susceptible

Tabla 3: Características Fisiológicas y Morfológicas de la Línea EUR 154-1021 GY.

	CARACTERÍSTICA	EUR 154-1021 GY
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Fresco
	Cultivo predominante	Invernadero
	Área de Mejor Adaptación en Estados Unidos	España
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65
3.	Planta	
	Forma predominante	Enredadera
	Crecimiento	Indeterminado

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	EUR 154-1021 GY
	Sexo	Ginoico
	Color de la Flor	Amarillo
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Longitud del Internodo	50-80 mm
	Forma de Tallo	Acanalada
5.	Fruta en madurez comestible	
	Longitud	30-32 cm
	Diámetro en la media	45-50 mm
	Peso	300-400 g
	Color de piel	Verde medio
	Tiras de extremo de flor amarillentas	No
	Color predominante en el extremo del tallo	Verde uniforme
	Color predominante en el extremo de la flor	Verde uniforme
	Forma del cuello de la fruta	Sin Cuello
	Aguzamiento de fruta	Redondeado
	Sección transversal del extremo del tallo	rd
	Sección transversal en la media	rd
	Sección transversal del extremo de flor	Rd
	Espesor de la piel	Delgado
	Nervaduras de la piel	Acanaladas
	Dureza de la piel	Baja
	Lustre de la piel	Brillante
	Color de espina	Blanco

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	EUR 154-1021 GY
	Calidad de espina	Fina
	Densidad de espina	Bajo
	Tubérculos (Verrugas)	No
	Sabor	Libre de amargor
6.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	35-37 cm
	Diámetro en la media	50-60 mm
	Color	Amarillo
	Patrón de color	A rayas
	Superficie	Suave
	Enmallado	Ligero
	Conjunto de frutas	Normalmente sin semillas
7.	Semillas	
	Nº por Fruta	30-80
	Por 1000 semillas	30-35 g
8.	Resistencia a enfermedades	
	Mildiu veloso	Resistente
	Mildiu pulverulento (<i>Erysiphechichoracearum</i>)	Resistente
	Virus mosaico del pepino	Susceptible
	Virus de amarilleamiento de venas de pepino	Susceptible
	Virus del trastorno de atrofia del pepino amarillo	Resistencia intermedia
9.	Resistencia a insectos	
	Áfido (<i>Aphis gossypii</i>)	Susceptible

Tabla 4: Características fisiológicas y morfológicas de la línea GSP 33-1094 GY.

	CARACTERÍSTICA	GSP 33-1094 GY
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Encurtido
	Cultivo predominante	Al aire libre
	Área de mejor adaptación en Estados Unidos	La mayoría de las áreas
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-62
3.	Planta	
	Forma predominante	Enredadera
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	100 % ginoico
	Color de la flor	Amarillo
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Número de nodos desde las hojas de cotiledón hasta el nodo que lleva la primera flor de pistilo	3-4
	Longitud del internodo	20-30
	Forma de Tallo	Acanalada
5.	Hoja	Limbo maduro de tercera hoja
	Longitud	200-250 mm
	Anchura	150-200 mm
	Longitud del Pecíolo	6.5 - 8
6.	Fruta en madurez comestible	
	Longitud	12-14 cm
	Diámetro en la media	35-45
	Peso	80-120 g

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	GSP 33-1094 GY
	Color de piel	Moteado o con manchas amarillas
	Tiras de extremo de flor amarillentas	Se extienden menos de 1/3 de la longitud de la fruta
	Color predominante en el extremo del tallo	Verde medio
	Color predominante en el extremo de la flor	Verde claro (espina blanca de Arlington)
	Forma del cuello de la fruta	Sin cuello
	Aguzamiento de fruta	Termina roma o redondeada
	Sección transversal del extremo del tallo	Cuadrada
	Sección transversal en la media	Cuadrada
	Sección transversal del extremo de flor	Cuadrada
	Espesor de la piel	Grueso
	Nervaduras de la piel	Acanalada
	Dureza de la piel	Blanda
	Lustre de la piel	Opaco
	Color de espina	Blanco
	Calidad de espina	Fina
	Densidad de espina	Muchas
	Tubérculos (Verrugas)	Pocos, prominentes (Ensalada)
	Sabor	Libre de amargor
7.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	25-30 cm
	Diámetro en la media	10-13
	Color	Crema
	Patrón de color	Sin Rayas

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	GSP 33-1094 GY
	Superficie	Suave
	Red	Ligero o ninguno
	Conjunto de frutas	Partenocápticamente
8.	Semillas	
	No. Por Fruta	150-200
	Por 1000 Semillas	22-25 g
9.	Resistencia a las Enfermedades	
	Costra de pepino (Gumosis) (<i>Cladosporiumcucumerinum</i>)	Susceptible
	Mildiu veloso	Resistente
	Mildiu pulverulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Resistente
	Punto objetivo (<i>Corynesporacassicola</i>)	Susceptible
	Virus mosaico del pepino	Resistente
10.	Resistencia a insectos	
	Áfido (<i>Aphis gossypii</i>)	Susceptible

Tabla 5: Características fisiológicas y morfológicas de la línea GPN 33-1093 GY.

	CARACTERÍSTICA	GPN 33-1093 GY
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Encurtido
	Cultivo predominante	Al aire libre
	Área de mejor adaptación en estados unidos	La mayoría de las áreas
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65
3.	Planta	
	Forma predominante	Enredadera

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	GPN 33-1093 GY
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Principalmente ginoico
	Color de la flor	Amarilla
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Número de nodos desde las hojas de cotiledón hasta el nodo que lleva la primera flor de pistilo	2-3
	Longitud del Internodo	20-25
	Forma de tallo	Acanalada
5.	Hoja	Limbo maduro de tercera hoja
	Longitud	200-230 mm
	Anchura	150-200 mm
	Longitud del peciolo	4 - 8
6.	Fruta en madurez comestible	
	Longitud	11-13 cm
	Diámetro en la media	35-45
	Peso	80-120 g
	Color de piel	Moteado o con manchas amarillas
	Tiras de extremo de flor amarillentas	menos de 1/3 de la longitud de la fruta
	Color predominante en el extremo del tallo	Verde medio
	Color predominante en el extremo de la flor	Verde claro (Espina blanca de Arlington)
	Forma del cuello de la fruta	Sin cuello
	Aguzamiento de fruta	Termina roma o redondeada
	Sección transversal del extremo del tallo	Cuadrada

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	GPN 33-1093 GY
	Sección transversal en la media	Cuadrada
	Sección transversal del extremo de flor	Cuadrada
	Espesor de la Piel	Gruesa
	Nervaduras de la piel	Acanalada
	Dureza de la Piel	Tierna
	Lustre de la piel	Opaco
	Color de espina	Blanco
	Calidad de espina	Fina
	Densidad de espina	Pocas
	Tubérculos (Verrugas)	Pocos, Prominentes (Ensalada)
	Sabor	Libre de amargor
7.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	25-30 cm
	Diámetro en la media	10-13
	Color	Crema
	Patrón de color	A rayas
	Superficie	Suave
	Red	Ligero o ninguno
	Conjunto de frutas	Normalmente con semillas
8.	Semillas	
	Nº por fruta	150-200
	Por 1000 Semillas	22-25 g
9.	Resistencia a las Enfermedades	
	Costra de pepino (Gumosis) (<i>Cladosporiumcucumerinum</i>)	Susceptible

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	GPN 33-1093 GY
	Mildiu veloso	Resistente
	Mildiu pulverulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Resistente
	Punto objetivo (<i>Corynesporacassiicola</i>)	Susceptible
	Virus mosaico del pepino	Resistente
10.	Resistencia a insectos	
	Áfido (<i>Aphis gossypii</i>)	Susceptible

Tabla 6: Características fisiológicas y morfológicas: línea 03 / 8020-20_TUP03_DMFL_1.

	CARACTERÍSTICA	03/8020-20_TUP03_DMFL_1
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Fresco
	Cultivo predominante	Al aire libre
	Área de mejor adaptación en Estados Unidos	Turquía y Medio Oriente
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65
3.	Planta	
	Forma predominante	Enredadera
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Monoica
	Color de la flor	Amarilla
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Longitud del internodo	30-50 mm
	Forma de tallo	Acanalada

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	03/8020-20_TUP03_DMFL_1
5.	Fruta en madurez comestible	
	Longitud	12-15 cm
	Diámetro en la media	35-45
	Peso	80-120 g
	Color de Piel	Verde
	Tiras de extremo de flor amarillentas	No
	Color predominante en el extremo del tallo	Verde uniforme
	Color predominante en el extremo de la flor	Verde uniforme
	Forma del cuello de la fruta	Sin cuello
	Aguzamiento de fruta	Termina roma o redondeada
	Sección transversal del extremo del tallo	rd
	Sección transversal en la media	rd
	Sección transversal del extremo de flor	rd
	Espesor de la Piel	Delgada
	Nervaduras de la piel	No acanalada
	Dureza de la Piel	Baja
	Lustre de la Piel	Brillante
	Color de Espina	Blanco
	Calidad de espina	Fina
	Densidad de espina	Alta
	Tubérculos (Verrugas)	No

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	03/8020-20_TUP03_DMFL_1
	Sabor	Sin amargor
6.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	18-20 cm
	Diámetro en la media	30-45 mm
	Color	Crema
	Patrón de Color	A rayas
	Superficie	Suave
	Red	Ligero o ninguno
	Conjunto de frutas	Normalmente con semillas
7.	Semillas	
	Nº por fruta	150-200
	Por 1000 semillas	22-25 g
8.	Resistencia a enfermedades	
	Costra de pepino (<i>Gumosis</i>) (<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	Resistente
	Mildiu veloso	Resistente
	Mildiu pulverulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Susceptible
	Virus mosaico del pepino	Susceptible
9.	Resistencia a insectos	
	Áfido (<i>Aphis gossypii</i>)	Susceptible

Tabla 7: Características Fisiológicas y Morfológicas: Línea 03/8024-19_TUP03_DMFL_1.

	CARACTERÍSTICA	03/8024-19_TUP03_DMFL_1
	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Fresco
	Cultivo predominante	Al aire libre
	Área de Mejor Adaptación en Estados Unidos	Turquía y Medio Oriente
	Madurez	
	Días Desde la siembra hasta el mercado	60-65
	Planta	
	Forma predominante	Enredadera
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Monoico
	Color de la flor	Amarillo
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Longitud del internodo	30-50 mm
	Forma de tallo	Acanalada
5.	Fruta en madurez comestible	
	Longitud	15-17 cm
	Diámetro en la media	35-45
	Peso	80-120 g
	Color de piel	Verde
	Tiras de extremo de flor amarillentas	No
	Color predominante en el extremo del tallo	Verde uniforme
	Color predominante en el extremo de la flor	Verde uniforme
	Forma del cuello de la fruta	Sin cuello
	Aguzamiento de fruta	Extremos romos o redondeados

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	03/8024-19_TUP03_DMFL_1
	Sección transversal del extremo del tallo	rd
	Sección transversal en la media	rd
	Sección transversal del extremo de flor	rd
	Espesor de la piel	Delgado
	Nervaduras de la piel	No acanalada
	Dureza de la piel	Bajo
	Lustre de la piel	Brillante
	Color de espina	Blanco
	Calidad de espina	Fina
	Densidad de espina	Baja
	Tubérculos (Verrugas)	No
6.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	12-23 cm
	Diámetro en la media	30-45 mm
	Color	Crema
	Patrón de color	A rayas
	Superficie	Suave
	Red	Ligero o ninguno
	Conjunto de frutas	Normalmente con semillas
7.	Semillas	
	Nº por fruta	150-200
	Por 1000 semillas	22-25 g
8.	Resistencia a enfermedades	
	Costra de pepino (Gumosis) (<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	Susceptible

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	03/8024-19_TUP03_DMFL_1
	Mildiu veloso	Resistente
	Mildiu pulverulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Resistencia intermedia
	Virus mosaico del pepino	Resistente
9.	Resistencia a insectos	
	Áfido (<i>Aphis gossypii</i>)	Susceptible

Tabla 8: Características Fisiológicas y Morfológicas: Línea 03/8039-5_TUP03_DMFL_1.

	CARACTERÍSTICA	03/8039-5_TUP03_DMFL_1
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Fresco
	Cultivo predominante	Al aire libre
	Área de mejor adaptación en Estados Unidos	Turquía y Medio Oriente
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65
3.	Planta	
	Forma predominante	Enredadera
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Monoico
	Color de la flor	Amarilla
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Longitud del internodo	30-50 mm
	Forma de tallo	Acanalada
5.	Fruta en madurez comestible	
	Longitud	16-18 cm

ES 2 751 104 T3

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	03/8039-5_TUP03_DMFL_1
	Diámetro en la media	35-45
	Peso	80-120 g
	Color de piel	Verde
	Tiras de extremo de flor amarillentas	No
	Color predominante en el extremo del tallo	Verde uniforme
	Color predominante en el extremo de la flor	Verde uniforme
	Forma del cuello de la fruta	Sin Cuello
	Aguzamiento de fruta	Extremos romos o redondeados
	Sección transversal del extremo del tallo	rd
	Sección transversal en la media	rd
	Sección transversal del extremo de flor	rd
	Espesor de la piel	Delgada
	Nervaduras de la piel	No Acanalada
	Dureza de la piel	Baja
	Lustre de la piel	Brillante
	Color de espina	Blanco
	Calidad de espina	Fina
	Densidad de espina	Medio
	Tubérculos (Verrugas)	No
	Sabor	Libre de amargor
6.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	20-24 cm
	Diámetro en la media	30-45 mm
	Color	Crema

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	03/8039-5_TUP03_DMFL_1
	Patrón de color	A rayas
	Superficie	Suave
	Red	Ligero o ninguno
	Conjunto de frutas	Normalmente con semillas
7.	Semillas	
	No. por fruta	150-200
	Por 1000 semillas	22-25 g
8.	Resistencia a enfermedades	
	Costra de pepino (Gumosis) (<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	Resistente
	Mildiu veloso	Resistente
	Mildiu pulverulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Resistencia intermedia
	Virus mosaico del pepino	Susceptible
9.	Resistencia a insectos	
	Áfido (<i>Aphis gossypii</i>)	Susceptible

5 Se describe una planta de pepino resistente al DM, o la fruta o semillas de la misma, en la que la planta de pepino demuestra una reducción en los síntomas foliares de lesiones cloróticas y/o necróticas en relación con una planta de control no resistente tras la inoculación o infección con DM, y en donde la dicha planta demuestra resistencia a uno o más de la marchitez por *Verticillium*, nematodos del nudo de la raíz, Virus mosaico del tabaco, costra de pepino, mildiu pulverulento, corinesporiosis, virus mosaico del pepino, virus de la mancha anular de papaya, virus mosaico amarillo del calabacín y marchitamiento por *Fusarium*. Esas plantas de pepino, o la fruta o semillas de las mismas, 10 se seleccionan de la progenie resistente a DM de las líneas descritas en las Tablas 1-8. La planta de pepino resistente al DM también puede demostrar resistencia a uno o más de: marchitez de *Verticillium*, costra de pepino, mildiu pulverulento, corinesporiosis, virus mosaico del pepino, nematodos, virus mosaico del tabaco, virus de la mancha anular de la papaya, virus mosaico amarillo del calabacín, y marchitez de *Fusarium* muestra una reducción superior al 10 %, o una reducción mayor del 30 %, o una reducción mayor del 60 % en los síntomas foliares de 15 lesiones cloróticas y/o necróticas tras la inoculación o infección con DM. Las plantas de pepino se pueden adaptar para el crecimiento en invernadero o para el crecimiento en el campo.

También se divulga una planta de pepino DM, o la fruta o semillas de la misma, en la que la planta de pepino, o la fruta de la misma, expresa uno, dos, tres o más rasgos deseables seleccionados independientemente además de la resistencia al DM. El "rasgo deseable" o los "rasgos deseables" pueden seleccionarse del grupo que consiste en: 20 tamaño de fruta, forma, color, apariencia superficial; número de semilla, tamaño de semilla, número de lóculo; grosor y tenacidad del pericarpio; sabor, amargor, presencia de tubérculos y vida útil, vigor de la planta, forma de la hoja, longitud de la hoja, color de la hoja, altura de la planta, si la planta está determinada o no, tiempo de maduración, adaptación al crecimiento del campo, adaptación al crecimiento del invernadero, y resistencia a una o más enfermedades o organismos que causan enfermedades, tales como *Verticillium Wilt*, nematodos del nudo de la raíz, virus mosaico del tabaco, costra del pepino, mildiu pulverulento, mildiu veloso, corinesporiosis, virus mosaico del pepino y marchitamiento por *Fusarium*. El "rasgo deseable" o los "rasgos deseables" también pueden seleccionarse 25

del grupo que consiste en: tamaño de fruta, forma de fruta, color de fruta, sabor de fruta, número de semillas por fruta, tamaño de semillas, grosor del tejido del pericarpio de la fruta, la vida útil de la fruta, resistencia al marchitamiento por *Verticillium Wilt*, resistencia a la costra del pepino, resistencia a mildiu pulverulento, resistencia al punto objetivo, resistencia al virus mosaico del pepino, resistencia a los nematodos, resistencia al virus mosaico del tabaco, resistencia al virus de la mancha anular de la papaya, resistencia al virus mosaico amarillo del calabacín y resistencia al marchitamiento por *Fusarium*. Además, el "rasgo deseable" o los "rasgos deseables" pueden seleccionarse del grupo que consiste en: tamaño de fruta, forma de fruta, color de fruta, sabor de fruta, la vida útil de la fruta, resistencia a la costra de pepino, resistencia a mildiu pulverulento, resistencia al punto objetivo y resistencia al virus mosaico del pepino. Aún más, el "rasgo deseable" o "rasgos deseables" pueden seleccionarse del grupo que consiste en: tamaño de fruta, forma de fruta, color de fruta, calidad de fruta aceptable para el mercado y la vida útil de la fruta.

Las plantas que tienen uno o más rasgos deseables además de la resistencia al DM pueden mostrar una reducción mayor del 10 %, o mayor del 30 %, o mayor del 60 % o mayor del 80 % en los síntomas foliares de cloróticos y/o lesiones necróticas en relación con una planta de control no resistente tras la inoculación o infección con DM. También se divulga un procedimiento para producir una planta de pepino resistente a DM que comprende: cruzar una línea de pepino que tiene resistencia a DM con una segunda planta que no tiene resistencia a DM pero capaz de donar uno o más de los rasgos deseables mencionados anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo de mildiu vellosa y cribado de enfermedades - Campo

Pseudoperonospora cubensis (Berk. Et Curt.) El Rostow es un patógeno obligatorio. Por lo tanto, debe mantenerse en plantas vivas de una cucurbitácea susceptible. Se utilizaron dos aislados en el cribado para resistencia en este estudio. El aislado "viejo" de *P. cubensis* se caracteriza por su patogenicidad tanto en la calabaza como en el pepino. El "nuevo" aislado de *P. cubensis* no se considera patógeno en la calabaza, pero es muy patógeno en el pepino. El patógeno se almacenó congelando hojas o cotiledones con abundante esporulación a -80°C. Aunque puede haber alguna pérdida en la viabilidad de las esporas inherente al proceso de congelación, no se ha encontrado una disminución en la viabilidad con el tiempo una vez que se congelan las esporas. Seis semanas antes de que se trasplantaran las plantas huésped del esparcidor en el campo, se plantaron huéspedes susceptibles de pepino en una cámara de ambiente controlado. A las tres semanas fueron inoculados con una suspensión de esporas derivada de hojas infectadas almacenadas en un congelador a -80°C. Las plantas de cultivo inoculadas se mantuvieron a 20°C; Una vez que se han desarrollado las lesiones cloróticas, las plantas se colocaron en la cámara de rocío durante la noche para inducir la esporulación. Este cultivo se transfirió semanalmente con pepino hasta que las plantas se trasplantaron al campo.

Los ensayos se sembraron directamente en el campo. Se sembraron hileras de pepinos susceptibles en cada tercera hilera. Cuando las hileras esparcidoras tenían dos o tres semanas de edad, las plantas infectadas (criadas en la sala de crecimiento) se trasplantaron dentro de las hileras esparcidoras. Las pruebas de reproducción se realizaron simultáneamente. Las parcelas se mantuvieron en buenas condiciones hortícolas, de acuerdo con las técnicas normalmente empleadas para el cultivo de pepinos en el Sureste.

Se inocularon plantas esparcidoras en la etapa de tres a cuatro hojas en el invernadero mediante nebulización con suspensión esporangial usando una botella de aspersión. El inóculo se formuló en agua destilada estéril. Después de la inoculación, las plantas se colocaron en la cámara de rocío al 100 % de HR y 20°C, durante 18-24 horas. Las plantas esparcidoras se trasplantaron al campo donde un aspersor sólido proporcionaba un período húmedo nocturno para fomentar el desarrollo y la propagación de la enfermedad.

Las pruebas se evaluaron una vez que se desarrollaron los síntomas en la verificación susceptible, a veces llamado control susceptible. Controles que incluyen PI197088 (control resistente); DMP21, GP14, LLP 1, POINSETT 76, (controles de resistencia intermedia); y SPRINT440, MARAM y SMR58 (controles susceptibles) fueron utilizados. Se hicieron tres observaciones en cada parcela, una en cada extremo y otra en el medio. Se calculó el índice medio de enfermedad para cada parcela. Estos se promediaron para las tres réplicas y se determinó la desviación estándar. Luego se determinaron los rangos del índice de enfermedad para las categorías "Resistente", "Resistente intermedia" y "Susceptible". Las variedades generalmente se probaron varias veces antes de que se hiciera una determinación final del nivel de resistencia a la enfermedad. Se utilizó un diseño completamente aleatorio en la prueba de la enfermedad. Cada línea se repitió tres veces: se analizaron aproximadamente 40 plantas por entrada. Las líneas con semillas limitadas disponibles se incluyeron como una parcela de observación de una sola representación. Los controles se incluyeron como entradas para medir la gravedad de la prueba. Las parcelas tenían 3,66 m (12 pies) de largo con un callejón de 0,91 m (3 pies) entre los extremos de los bloques. Se plantó un esparcidor susceptible en cada tercera fila y en los bordes exteriores de toda la plantación.

Ejemplo 2: cultivo de mildiu vellosa y cribado de enfermedades - Invernadero

Pseudoperonospora cubensis (Berk. Et Curt.) Rostow, tal como se describió y almacenó anteriormente en el Ejemplo 1, también se usó para cribado en invernadero. Dos semanas antes de la inoculación de cribado, se sembraron huéspedes susceptibles de pepino en bandejas para plántulas. Una semana después de la siembra, las plántulas se

inoculan con una tasa de aproximadamente 5×10^4 esporangios/ml. Los huéspedes inoculados se colocaron luego en una cámara de crecimiento y se mantuvieron durante siete días a 21°C (70°F). Después de siete días, las plántulas se colocaron en una cámara de rocío durante la noche para inducir la esporulación. Este cultivo se transfirió a huéspedes de pepino susceptibles semanalmente.

- 5 Las cribas de cotiledón se plantaron en bandejas para plántulas. Se plantaron controles susceptibles y resistentes en ambos lados de cada bandeja. Las plantas se sembraron y mantuvieron en un invernadero a 23°C (80 °F). La inoculación se realizó a los 7 a 10 días para los cotiledones y en la etapa de la 5ª hoja para las hojas verdaderas. Las plantas se inocularon mediante nebulización con suspensión esporangial usando una botella de aspersión a una concentración de aproximadamente 5×10^4 esporangios por ml para cotiledones y 1×10^4 a 3×10^4 para hojas verdaderas. Después de la inoculación, las plantas se colocaron en una cámara de rocío al 100 % de humedad relativa y 20°C, durante 18-24 horas.

- 15 Las pruebas se evaluaron una vez que se desarrollaron los síntomas en la verificación susceptible, a veces llamado control susceptible. Los controles utilizados fueron PI197088 (control resistente) MARAM (control susceptible) y SMR58 (control resistente). Los supervivientes resistentes e intermedios de las cribas de cotiledón se mantuvieron y se trasplantaron en macetas de turba de 7,6 cm (3 pulgadas) para volver a inocularse o para trasplantarse a bolsas de cultivo de invernadero. Los supervivientes resistentes e intermedios de las cribas de hoja verdaderas se trasplantaron directamente en bolsas de cultivo de invernadero.

Ejemplo 3: Introgresión de resistencia a DM en líneas de pepino

- 20 Se descubrió que la resistencia a mildiu vellosa identificada en la línea de introducción de Plantas PI197088 era estable en múltiples ubicaciones de cribado en todo el mundo y contra aislamientos de *P. cubensis* más antiguos (patógenos en la calabaza y el pepino) y recién emergidos (no considerados patógenos en la calabaza y muy patógenos en el pepino). Sin embargo, tanto las plantas como las frutas de PI197088 son comercialmente inaceptables. Un locus que contribuye a la resistencia a mildiu vellosa en PI197088 se mapeó con marcadores moleculares como se describe en el Ejemplo 4. Un total de aproximadamente 128 líneas de pepino se cribaron por separado usando uno o ambos aislamientos de DM. El ADN se aísla de líneas resistentes para cribar polimorfismos marcadores entre el donante y los progenitores recurrentes.

- 30 En estas cribas se incluyen las variedades de pepino Conquistador, Crispina, DMP21 y PI197088, entre otras, que son resistentes o de resistencia intermedia. También se incluyen Colt, Sprint440, Talladega, Lucinde y Serena, entre otros, como líneas de control susceptibles. Se recogieron muestras de tejido de cada una de las líneas resistentes a DM para su uso en análisis de ADN y producción de una biblioteca de ADN para identificar marcadores asociados con resistencia a DM. También se obtuvieron semillas de cada una de las líneas que demostraron resistencia al DM generalmente a través de polinizaciones con polen mezcladas dentro de cada acceso, y cuando fue posible autónoma. Las polinizaciones con polen mixtas se usaron en general en pepinos de tipo salvaje, ya que a menudo contienen un factor de autoincompatibilidad.

- 35 Se realizaron cruces iniciales entre PI197088 y un progenitor susceptible recurrente para crear plantas F₁. Las plantas derivadas de estos cruces se usaron para la prueba de enfermedades como se describe en los Ejemplos 1 y/o 2. Se realizaron experimentos para cribar para resistencia al DM en una colección de líneas de élite que muestran tipos de plantas y frutas hortícolamente aceptables, y deberían tener la resistencia al DM con introgresión de PI197088. Estas pruebas se realizaron en tres ubicaciones (Woodland, CA, Tifton, GA, y Wageningen, NL) y se utilizaron dos aislados de *Pseudoperonospora cubensis*: un aislado "más antiguo", patógeno en calabaza y pepino, y el aislado "nuevo" putativo, no considerado patógeno en la calabaza pero muy virulento en el pepino. Simultáneamente, estas muestras se genotipificaron con marcadores moleculares para identificar una resistencia QTL que contribuye al DM en PI197088 (véase también el Ejemplo 4). Estas pruebas asocian la respuesta de la patología DM con la presencia de un alelo de PI197088. Durante este tiempo, los obtentores que presentaron las muestras reunieron todos los datos de prueba disponibles en estas líneas en las que se anotan o cuantifican los tipos de plantas y frutas. Las siguientes líneas que se muestran en las Tablas 9-10 se seleccionaron para cribado para resistencia a Mildiu vellosa.

Tabla 9: Pedigrís para líneas de pepino para las cuales se hizo un depósito de semillas.

<u>Aislado de DM</u>	
Línea de Pepino	Pedigrí
ASL147-2027	PI-197088-MO/ASL-1105-GY:@.1.1.1.1.4.
EUR154-1012GY	[(ALCOR(WMV)xVENTURAxPIDM/NIZ335*2)X(ALCOR(V)xVENTURAxPIDM/CARMEN*2)]X[(ALCOR(V)xVENTURAxPIDM/CARMEN*2)X(ALCOR(V)xVENTURAxPIDM/CARMEN*2)]

(continuación)

<u>Aislado de DM</u>	
Línea de Pepino	Pedigrí
EUR154-1021GY	(ALCOR(WMV)xVENTURAxPIDM/NIZ335*2)X(ALCOR(V)xVENTURAxPIDM/CARMEN*2)
GSP33-1094GY	F9-(Jazz/5/Sal//SMR-58Nim/PiHoNi/3/NO-50/4/H-171wit/SMR-58Nim//Carol/3/NO-50 Harmonie) *
GPN33-1093GY	F8-(Jazz/5/Sal//SMR-58Nim/PiHoNi/3/NO-50/4/H-171wit/SMR-58Nim//Carol/3/NO-50)
03/8020-20_TUP03_D MFL_1	BA.KO {(147W*PI)*225} * (BA MO*part) BC4 03/8020-20_ TUP03_DMFL_ 1+---1_ TUNE03_DM-2_ TUp05_TKFA06
03/8024-19_TUP03_D MFL_1	BA.KO {(147W*PI)*225} * [(me/n*147wmv)bc4f5*(bamo*parth)bc4f5] 03/8024-19_TUP03_DMFL_1+---4_ TUNE03_DM-1 TUp05 TKFA06
03/8039-5_TUP03_DM FL_ 1	BA.KO {(147W*PI)*225} * HP 159] * [(BA MO*part) BC4 03/8039-5_ TUP03_DMFL_ 1+---3_ TUNE03_DM-4_ TUp05 TKFA06

Tabla 10: Haplotipos de marcadores y puntuaciones de reacción a mildiu vellosa (DM) asociadas para cinco marcadores en la región QTL de resistencia a DM. Los datos representan treinta y siete líneas de pepino.

Marcador	posición cM¹	Hap². 1	Hap. 2	Hap. 3	Hap. 4	Hap. 5
Marcadores y haplotipos de muestra						
CAPs_ENK60	4	SUS ³	SUS	RES ⁴	RES	RES
CAPs_ENK59	5	SUS	SUS	RES	RES	RES
CAPs_17170	11	SUS	SUS	SUS	SUS	RES
CAPs_17179	11	SUS	SUS	SUS	SUS	RES
CAPs_17563/66	39	SUS	RES	SUS	RES	RES
Estadísticas resumidas de mildiu vellosa asociadas con haplotipos de marcadores						
Media (DM ⁵)		4,8	4,5	4,0	2,2	3,3
Mínimo (DM)		4,3	3,3	3,7	1,0	1,0
Máximo (DM)		5,0	5,0	4,3	3,3	5,0
Desviación estándar (DM)		0,2	0,6	0,3	0,5	1,2
Número de líneas con haplotipo		3	3	1	19	11

(continuación)

Marcador	posición cM ¹	Hap ² . 1	Hap. 2	Hap. 3	Hap. 4	Hap. 5
¹ cM = centiMorgans. ² Hap = Haplotipo en cinco marcadores en DM QTL. ³ SUS = alelo susceptible al mildiu veloso asociado con el progenitor Lucinde en el mapeo de la población. ⁴ RES = Alelo de resistencia a mildiu veloso asociado con el progenitor P1197088 en el mapeo de la población. ⁵ DM = puntuaciones fenotípicas en una prueba de patología para Mildiu veloso.						

5 Se analizaron treinta y siete líneas de pepino para detectar reacciones a *Pseudoperonospora cubensis* en una criba de patología controlada. Dieciocho plantas fueron probadas en tres réplicas de seis plantas. De cada replicación, tres plantas (total de tres réplicas = 9) se genotipificaron para cinco marcadores que definen la región DM QTL. A partir de estos datos, se desarrollaron genotipos de marcadores de consenso y estadísticos de resumen de DM para cada línea. Estos datos se resumen en la Tabla 10. Los cinco marcadores utilizados en esta prueba se seleccionaron de los ocho marcadores vinculados en el DM QTL. Los cinco marcadores se seleccionaron en función de un rendimiento confiable en el laboratorio y/o asociaciones con el fenotipo DM que fueron más consistentes que los otros marcadores.

10 La Tabla 10 apoya la asociación del haplotipo RES-RES-SUS-SUS-RES en los marcadores CAPs_ENK60, CAPs_ENK59, CAPs_17170, CAPs_17179, CAPs_17563/66 con un fenotipo más resistente al DM. La sustitución del alelo SUS con el alelo RES en los marcadores CAPs_ENK60, CAPs_ENK59, CAPs_17563/66 produce un cambio en el fenotipo DM medio de 4,8 a 2,2 en pruebas donde 1 = resistente y 5 = susceptible.

15 **Ejemplo 4: Análisis de marcadores de plantas de pepino resistentes a DM**

20 Las plantas resistentes se analizan utilizando marcadores genéticos distribuidos por todo el genoma del pepino. Los marcadores genéticos para *Cucumis* están disponibles en una variedad de fuentes, como USDA-ARS (Vegetable Crops Research Unit-Department of Horticulture, University of Wisconsin-Madison). Se pre-cribó un conjunto más grande de marcadores en las líneas parentales y se seleccionaron marcadores polimórficos, de entre los marcadores pre-cribados, para una criba posterior. Luego se estableció una correlación con la mayoría de las plantas resistentes y la presencia de alelos de donantes específicos, por ejemplo, como se muestra en la Tabla 10 y la FIGURA 2. La mayoría de las plantas resistentes contenían ADN por introgresión de la línea de donantes resistentes, P119788, por ejemplo en los loci como se muestra en la FIGURA 2. Se construyó un modelo de regresión múltiple para retener los marcadores que contribuyeron al fenotipo de resistencia a DM. En este análisis, los marcadores CAPs_ENK60, CAPs_17170 y CAPs_17563 / 66 se mantuvieron significativos, generando un modelo con R² de 0,47.

25 Los pares de cebadores y las condiciones de reacción utilizadas para definir el QTL para la resistencia al DM en *Cucumis sp.* se muestran en la Tabla 11 y la Tabla 12.

Tabla 11. Pares de cebadores utilizados (SEQ ID Nos: 1 a 17).

Nombre del marcador	Cebador de avance (5' a 3') (SEQ ID NO)	Cebador reverso (5' a 3') (SEQ ID NO)	Enzima	Condiciones de electroforesis	Notas
CAPs_21826	TCAAGCCATAGTCTAAC CCATGC (14)	CGCTATATCATGGATGGC TAGAAAT (15)	NsiI	Gel de agarosa al 3 %	
CAPs_ENK60	GAATAGATAGGCTACAC TTTTCCCTCTTG (1)	GTATAAAACTTIGAGTGAA TTTAATGCATGAA (2)	HpyCH4 IV	Gel de agarosa al 3 %	
CAPs_ENK59	IGTTTCATAA ACTACAGCT TCATGTTAAATATTA CT (3)	TAGTTTCTTTCTTIGCTGGA CGAACC (4)		Gel de agarosa al 3 %	
CAPs_17170	TATGGGCTATGTGAAAC ICTT (5)	AGCGTGACAACACTACAAAA CAT (6)	Afl III	Gel de agarosa al 3 %	
CAPs_17179	GAAATAAATGGATGAAG CGAGGA (7)	GTTCGTTGATCAGTGTGA TATTTCAAT (8)		Capilar	Cebador de avance para el alelo P1197088
CAPs_17179	ATCGGTCTTTGCCCACCTT TTG (9)	GTTCGTTGATCAGTGTGA TATAAT (8)		Capilar	Cebador de avance para el alelo de Lucinde
CAPs_18229	IGTTTGGAAAGGTTTCTI GGG (12)	IGCCATGTCGCCAACAGT (13)	HindIII	Gel de agarosa al 3 %	
CAPs_17563/66	AGGAGGACAGAGAGA ATTTGATATAAT (10)	TCCGTTT TAGGTGATTGTC AAATACAT (11)		Capilar	
CAPs_ENK70	AAAAGTTGATAGTGCATG AGTTGGTAAAATA (16)	TCCGCTTATGGGTTTTTGT GAG (18)	TaqI	Gel de agarosa al 3 %	

Tabla 12: Condiciones de reacción para PCR.

PCR para: marcadores ejecutados en gel de agarosa (CAPs_ENK60, CAPs_ENK59, CAPs_17170, CAPs_18229, CAPs_21826, CAPs_ENK70)		
Componente	Combinar por 10 µl de rxn	Mezcla maestra para 10:
Mezcla maestra HotStart-IT Taq (2X)	5	50
Cebador de avance de 5 µM	0,53	5,3
Cebador reverso 5 µM	0,53	5,3
MQ H ₂ O	3,14	31,4
ADN de plantilla	0,8	8
Suma	10	100
PCR para: CAPs_17179		
Componente	Combinar por 10 µl de rxn	Mezcla maestra para 10:
Mezcla maestra HotStart-IT Taq (2X)	5	50
Cebador 1 5 µM	0,53	5,3
Cebador 2 5 µM	0,53	5,3
Cebador con cola 5 µM	0,053	0,53
Cebador etiquetado 1475	0,53	5,3
MQ H ₂ O	2,557	25,57
ADN de plantilla	0,8	8
Suma	10	100
CR para: marcadores ejecutados en gel de agarosa (CAPs_ENK60, CAPs_ENK59, CAPs_17170, CAPs_18229, CAPs_21826, CAPs_ENK70)		
PCR para: CAPs_17563 / 66		
Componente	Combinar por 10 µl de rxn	Mezcla maestra para 10:
Mezcla maestra HotStart-IT Taq (2X)	5	50

CR para: marcadores ejecutados en gel de agarosa (CAPs_ENK60, CAPs_ENK59, CAPs_17170, CAPs_18229, CAPs_21826, CAPs_ENK70)		
PCR para: CAPs_17563 / 66		
Componente	Combinar por 10 µl de rxn	Mezcla maestra para 10:
Cebador 5 µM	0,53	5,3
Cebador con cola 5 µM	0,053	0,53
Cebador etiquetado 1475	0,53	5,3
MQ H ₂ O	3,087	30,87
ADN de Plantilla	0,8	8
Suma	10	100

- 5 El análisis de los marcadores genéticos se realizó mediante amplificación por PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de la siguiente manera: las reacciones de PCR contienen 1,0 µl de ADN genómico de pepino (10 ng), 2 µl de tampón de PCR 10x (tampón I ABI PCR: parte no. N808-0006), 1,0 µl de mezcla 10x dNTP (concentración final de cada dNTP es 250 µM), 1 µl de cada cebador (5 pmol de cada cebador), 0,2 µl de Taq Polimerasa (1 unidad) y agua estéril hasta un volumen total de 20 µl. Las reacciones de PCR se incuban durante 2 minutos a 94°C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 90 segundos a 72°C durante 35 ciclos, seguidos de un ciclo único de 72°C durante 5 minutos. Las reacciones de PCR se realizan, por ejemplo, en una máquina de PCR ABI9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).
- 10 La secuenciación del ADN genómico que flanquea los loci inicialmente cribados en la región QTL podría explicar parte de la variabilidad que se observó en algunos puntajes de resistencia al DM. Por ejemplo, en ciertas líneas con haplotipos resistentes, pero con puntajes de resistencia variable, la variabilidad podría verse cerca del marcador CAPs_17170. Por lo tanto, cuando las secuencias de alelos en este locus se compararon entre dos líneas dadas con diferentes puntajes de resistencia al DM, pueden haber coincidido en la posición explotada para el ensayo del marcador, por lo que ambos podrían definirse como el mismo genotipo.
- 15 Sin embargo, se encontró que las secuencias de tales líneas en algunos casos difieren, por ejemplo, en hasta 3 SNP en sitios cercanos pero no explotados por el ensayo marcador.
- 20 Se seleccionaron las plantas que contenían un(os) alelo(s) de donante resistente al DM, incluidas las líneas GSP33-1094GY y GPN33-1093, entre otras (véanse las Tablas 1-8 y 13) para su posterior reproducción. Dependiendo de la estrategia de reproducción, las plantas seleccionadas para la reproducción posterior pueden ser homocigotas o heterocigotas para un alelo donante (resistente).

Tabla 13: Rasgos agronómicos y de resistencia a enfermedades seleccionados para líneas adicionales con resistencia de DM intrínseca y líneas de comparación.

Líneas con alto nivel de resistencia al DM										Genotipos marcadores								
Código de línea	Fuente de semilla	Tipo	Patrón de floración	Partenocárpico	Planta libre de amargo	CMV	Scab(Cladosp. Cuc.)	PM (Sphaerotheca f.)	DM (Pseudop. Cuc.)	Liso/Con espinas	Color de la espina	CAPs ₋ ENK59	CAPs ₋ ENK60	CAPs ₋ 17179	CAPs ₋ 17170	CAPs ₋ 18229	CAPs ₋ 17563/66	Puntuación media de DM
05-346	NJ05 854-3	Preparación de encurtidos, partenocárpico con espinas	GY	Sí	Sí	1	1	2	2	Con espinas	Blanco	B	B	B	B	A	B	1,8
GSP33-1094GY	NJ05 696-4	Preparación de encurtidos, Partenocárpico liso	GY	Sí	No	2.5	5	1	2	Liso	XXXX	B	B	A	A	A	B	2,0
01-349	VJ02 322-6	Preparación de encurtidos, partenocárpico con espinas	GY	Sí	Sí	1.5	1	1	2	Con espinas	Blanco	B	B	B	B	A	B	2,3
GPN33-1093GY	VJ02 55-3	Preparación de encurtidos, polinizado con espinas	GY	No	No	3	5	2	2	Con espinas	Blanco	B	B	A	A	A	B	1,8

Líneas susceptibles a DM			Genotipos marcadores										media de DM						
Código de línea	Fuente de semilla	Tipo	Patrón de floración	Partenocárpico	Planta libre de amargo	CMV	Scab(Cladosp. Cuc.)	PM (Sphaerotheca f.)	DM (Pseudop. Cu.)	Liso/Con espinas	Color de la espina	CAPs_ENK59	CAPs_ENK60	CAPs_17179	CAPs_17170	CAPs_18229	CAPs_17563/66		
05-110	VJ05 110-3	Preparación de encurtidos, Partenocárpico liso	GY	Sí	Sí	2	1	1	4	Liso	XXXX	B	B	B	B	A	B		3,6
01-714	NJ05 684-4	Preparación de encurtidos, Partenocárpico liso	GY	Sí	Sí	2	1	2	4	Liso	XXXX	B	B	B	B	A	B		4,1
05-779	VJ05 273-4	Riesenchal partenocárpico	GY	Sí	Sí	5	5	5	5	Liso	XXXX	A	A	A	A	A	A		5,0

Se encontró que la línea 05-346 mostraba un fuerte vigor, con un color de fruta verde oscuro y frutas cilíndricas con una relación longitud/espesor de 3,2. Se encontró que la línea GSP33-1094GY muestra un fuerte vigor, con frutas

bastante largas (relación longitud/grosor de 3,3/3,4) y hojas algo verticales con poca tendencia a las hojas. La piel de la fruta era algo áspera. Se encontró que la línea 01-349 era productiva, con buena forma de fruta. La pulpa de la fruta fue firme, y las frutas mostraron una relación longitud / grosor promedio de 3,3. La línea GPN33-1093GY mostró un fuerte vigor. Las hojas estaban algo rizadas. Sus frutas eran ligeramente espinosas, pero la densidad de las espinas era muy baja. La relación longitud / grosor promedio de las frutas fue de 3,3.

Información de depósito

Se ha hecho, o se hará un depósito de 1000 semillas de las líneas propiedad de Seminis Vegetable Seeds ASL147-2027, EUR154-1012GY, EUR154-1021GY, GSP33-1094GY, GPN33-1093GY, 03/8020-20_TUP03_DMFL_1, 03/8024-19_TUP03_DMFL_1, y 03/8039-5_TUP03_DMFL_1, divulgados anteriormente y comprendidos en las reclamaciones adjuntas, con la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Va. 20110-2209 USA, una Autoridad Depositaria Internacional (IDA) según lo establecido en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes. Los números de acceso para las líneas ASL147-2027, EUR154-1012GY, EUR154-1021GY, GSP33-1094GY, GPN33-1093GY, 03/8020-20_TUP03_DMFL_1, 03/8024-19_TUP03_DMFL_1, y 03/8039-5_TUP03_DMFL_1 son ATCC Access No. 9375, Número de Acceso ATCC PTA-8930, Número de Acceso ATCC PTA-8931, Número de Acceso ATCC PTA-8953 y Número de Acceso ATCC PTA-8954, respectivamente. Las fechas de depósito fueron el 15 de julio de 2008, el 11 de febrero de 2008, el 11 de febrero de 2008, el 20 de febrero de 2008 y el 20 de febrero de 2008, respectivamente.

Listado de secuencias

<110> Shetty, Nischit Duran, M. Yolanda Gretenkort, Marie King, Joseph Grit, Albert Sipeyre, Bruno van Kooten, Henk

<120> PLANTAS DE PEPINO RESISTENTES AL MILDIU VELLOSO

<130> SEMS: 025WO

<140>Desconocido

<141> 2009-04-15

<150>US 61/045,551

<151> 2008-04-16

<160> 17

<170>PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 1

gaatagataggctacacttttccctcttg 29

<210> 2

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 2
 gtataaaacttgagtgaatttaatgcatga a 31
 <210> 3
 <211> 35
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 3
 10 tgtttcataactacagcttcatgtaaataattact 35
 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 4
 tagtttcttcttgctggacgaacc 25
 <210> 5
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 25 <400> 5
 tatgggctatgtgaaactct t 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 6
 agcgtgacaactacaaaaca t 21
 35 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 7
 5 gaaataaatggatgaagcgagga 23
 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 8
 gttcgtgatcagtgatattcaat 27
 <210> 9
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 20 <400> 9
 atcggctcttgccaccttt g 21
 <210> 10
 <211> 28
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 10
 aggaggacagagagaattgatataat 28
 30 <210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador sintético
 <400> 11
 tccgttttagtgattgtcaaatacat 27

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 12
 tgtttggaagggttcttgg g 21
 <210> 13
 10 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 15 <400> 13
 tgccatgtcgccaacagt 18
 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 14
 tcaagccatagtctaaccatgc 23
 25 <210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador sintético
 <400> 15
 cgctatatcatggatggctagaaat 25
 <210> 16
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 751 104 T3

<223> Cebador sintético
<400> 16
aaagttgatagtgcatgagttggtaaaata 30
<210> 17
5 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador sintético
10 <400> 17
tccgcttatgggttttggag 22

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de selección de una planta de pepino que tiene resistencia a mildiu veloso que comprende seleccionar al menos una primera planta de pepino de progenie resultante del cruce de una planta de pepino de acceso PI197088 que comprende resistencia a mildiu veloso y un primer marcador que es predictivo para la presencia de un locus que contribuye a la resistencia a mildiu veloso con una segunda planta de pepino que tiene al menos un rasgo deseado, en el que dicha primera planta de pepino de progenie comprende dicho primer marcador genético, en el que la selección comprende identificar la presencia de al menos el primer marcador genético en la primera progenie, y en el que dicho primer marcador genético se selecciona de los marcadores CAPs_21826 definidos por el par de cebadores de SEQ ID NOs: 14 y 15, CAPs_ENK60 definidos por el par de cebadores de SEQ ID NOs: 1 y 2, CAPs_ENK59 definidos por el par de cebadores de SEQ ID NOs: 3 y 4, CAPs_17170 definidos por el par de cebadores de SEQ ID NOs: 5 y 6, CAPs_17179 definidos por el par de cebadores de SEQ ID NOs: 7 o 9 y 8, CAPs_18229 definidos por el par de cebadores de SEQ ID NOs: 12 y 13, CAPs_17563/66 definidos por el par de cebadores de SEQ ID NOs: 10 y 11, y CAPs_ENK70 definidos por el par de cebadores de SEQ ID NOs: 16 y 17.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el rasgo deseado se selecciona de: tamaño de la fruta, forma, color, aspecto de la superficie; número de semillas, tamaño de semilla, número de lóculos; grosor y dureza del pericarpio; sabor, amargor, presencia de tubérculos, vida útil, vigor de la planta, forma de la hoja, longitud de la hoja, color de la hoja, altura de la planta, si la planta está determinada o no, tiempo de maduración, adaptación al crecimiento en campo, adaptación al crecimiento en invernadero, calidad de fruta aceptable para el mercado, y resistencia a una o más enfermedades u organismos causantes de enfermedades seleccionadas entre marchitez por Verticillium, nematodos de nudos de raíz, virus mosaico del tabaco, costra de pepino, mildiu pulverulento, corinesporiosis, virus mosaico del pepino y marchitez por Fusarium, virus de la mancha anular de la papaya, y virus mosaico amarillo del calabacín.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que seleccionar la primera progenie comprende además seleccionar la progenie basándose en la presencia de una pluralidad de marcadores genéticos de la segunda planta de pepino presente en la progenie.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el marcador genético se selecciona de CAPs_ENK60, CAPs_17170 y CAPs_17563/66.

FIG. 1

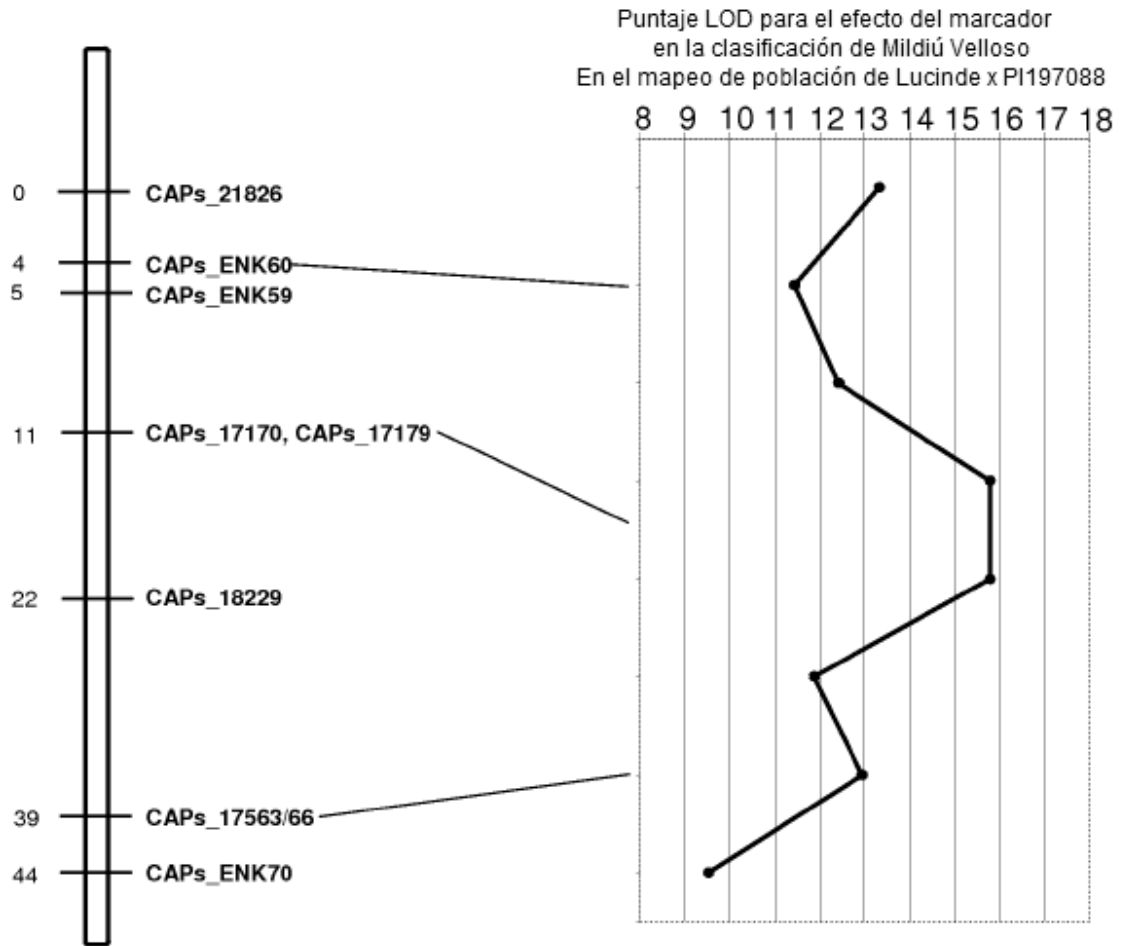


FIG. 2

