

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 457**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2008.01)

A01H 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2010 PCT/US2010/053812**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11050296**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2010 E 10825767 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 2491147**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para identificar plantas de pepino resistentes al moho vellosa**

30 Prioridad:

22.10.2009 US 254141 P

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

08.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CALDWELL, DAVID;
CHAN, EVA;
DE VRIES, JEROEN;
JOOBEUR, TAREK;
KING, JOSEPH;
REINA, ANTONIO y
SHETTY, NISCHIT**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 804 457 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

Procedimientos y composiciones para identificar plantas de pepino resistentes al moho veloso

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a procedimientos y sondas o cebadores de ácido nucleico aislados para obtener germoplasma de plantas de pepino que tienen resistencia al Moho Velloso.

10 **Antecedentes de la invención**

El pepino (*Cucumis sativus* L.) es un cultivo vegetal popular que se ha cultivado durante varios miles de años y se cultiva 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 el de mercado fresco (rebanadas) y el procesado (conservado en vinagre).

El Moho Velloso (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 se ve favorecida por las 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.

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 distintas en ambos lados de las hojas. La parte inferior de las hojas puede presentar un crecimiento de color gris blanquecino, marrón o azul claro, particularmente en condiciones húmedas. Este crecimiento veloso es de 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 pobre producción y calidad de la fruta. 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 por la salpicadura de la lluvia 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. Hasta ahora, se sabe que PI197088 es una cepa que es altamente resistente al DM (véase Angelov, D. et al. Proc. Cucurbitaceae 2000, Acla Hort. SIO, ISHS páginas 81-83 y 135-157 (2000). Además, El documento WO 2009/129314 (que es relevante en el estado de la técnica en virtud del Artículo 54 (3) EPC) divulga plantas de pepino resistentes al DM producidas al cruzar PI197088. 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 a al DM, y procedimientos para producir tales plantas.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para obtener germoplasma de pepino que comprende las etapas de: a) analizar las plantas de pepino para detectar la presencia de al menos un primer marcador genético ligado genéticamente a un QTL que confiere resistencia al Moho Velloso; y b) seleccionar al menos una primera planta de pepino que comprende el marcador genético y el QTL que confiere resistencia al Moho Velloso; en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0223689 y el marcador de SNP NN0228148 caracterizados por las SEQ ID NOs: 56 y 69, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 41,0 cM y 82,3 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino; en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0225012 y el marcador de SNP NN0227587 caracterizados por las SEQ ID NOs: 33 y 51, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 20,6 cM y 87,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0223782 y el marcador de SNP NN0226638 caracterizados por las SEQ ID NOs: 20 y 32, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 22,5 cM y 88,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 2 del pepino; o el mapa de marcadores genéticos dentro de 1 cM de dicho QTL que confiere resistencia al Moho Velloso. En realizaciones particulares, el alelo de QTL que confiere resistencia al Moho Velloso se deriva de la línea de pepino PI197088, o una planta de la progenie de la misma.

En ciertas realizaciones, el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247731 y el marcador de SNP NN0226631 caracterizados por las SEQ ID NOs: 57 y 77, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 44,8 cM y 55,5 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247731 y el marcador de SNP NN0247786 caracterizados por las SEQ ID NOs: 57 y 79,

respectivamente, que se mapean a aproximadamente 44,8 cM y 71,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino. En otras realizaciones, el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0228579 y el marcador de SNP NN0224495 caracterizados por las SEQ ID NO: 85 y 81, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 25,8 cM y 82,0 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino; en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0225088 y el marcador de SNP NN0224041 caracterizados por las SEQ ID NOs: 82 y 71, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 30,4 cM y 75,8 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0228579 y el marcador de SNP NN0224495 caracterizados por las SEQ ID NO: 85 y 81, que se mapean a aproximadamente 54,5 cM y 82,0 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino. En otra realización más, el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0223782 y el marcador de SNP NN0246472 caracterizados por las SEQ ID NOs: 20 y 24, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 22,5 cM y 38,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 2 del pepino.

En ciertas realizaciones, la invención también proporciona tal procedimiento, en el que seleccionar la primera planta de pepino comprende además seleccionar la planta con base en la presencia de una pluralidad de marcadores genéticos que se mapean a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0223689 y el marcador de SNP NN0228148 caracterizados por las SEQ ID NO: 56 y 69, respectivamente, que se mapea a aproximadamente 41,0 cM y 82,3 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247731 y el marcador de SNP NN0226631 caracterizados por las SEQ ID NOs: 57 y 77, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 44,8 cM y 55,5 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247731 y el marcador de SNP NN0247786 caracterizados por las SEQ ID NOs: 57 y 79, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 44,8 cM y 71,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0225012 y el marcador de SNP NN0227587 caracterizados por las SEQ ID NOs: 33 y 51, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 20,6 cM y 87,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247342 y el marcador de SNP NN0224495 caracterizados por las SEQ ID NOs: 43 y 81, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 54,5 cM y 82,0 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0223782 y el marcador de SNP NN0226638 caracterizados por las SEQ ID NOs: 20 y 32, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 22,5 cM y 88,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 2 del pepino.

Se divulga que el marcador genético se selecciona del grupo que consiste en los marcadores NN226219, NN0247551, NN0246357, NN0225551, NN0226732, NN0247689, NN0247342, NN0224702, NN0225482, NN0224538, NN0247543, NN0224041, NN0228853, NN0227762, NN0227587, NN0223689, NN0247731, NN0226166, NN0225480, NN0246411, NN0227759, NN0247348, NN0228465, NN0247786, NN0226645, NN0223809, NN0227071, NN0226870, NN0228148, NN0246378, NN0224041, NN0227587, NN0223160, NN0223809, NN0226631, NN0247786, NN0246425, NN0224495, NN0225088, NN0227071, NN0223782, NN0228579, NN0247342, y NN0247731, que comprende un polimorfismo de un solo nucleótido de una de las SEQ ID NOs: 20-87. En realizaciones particulares, el marcador genético se selecciona del grupo que consiste en los marcadores NN0223782, NN0225385, NN0226670, NN0224124, NN0246472, NN0225358, NN0227700, NN0224617, NN0247695, NN0227242, NN0223824, NN0223181, NN0226638, y NN0246378. En aún otras realizaciones, el marcador genético se selecciona del grupo que consiste en los marcadores NN0225012, NN0228579, NN0226451, NN0225088, NN0226219, NN0247551, NN0246357, NN0225551, NN0226732, NN0247689, NN0247342, NN0224702, NN0225482, NN0224538, NN0247543, NN0224041, NN0228853, NN0227762, NN0227587, NN0224041, NN0227587, NN0246425, NN0224495, NN0225088, NN0228579, y NN0247342. En incluso otras realizaciones, el marcador genético se selecciona del grupo que consiste en los marcadores NN0228457, NN0246356, NN0246332, NN0223399, NN0223689, NN0247731, NN0226166, NN0225480, NN0246411, NN0227759, NN0247348, NN0228465, NN0247786, NN0226645, NN0223809, NN0227071, NN0226870, NN0228148, NN0247786, NN0224856, NN0223160, NN0223809, NN0226631, NN0227981, NN0247786, NN0227071, y NN0247731. En realizaciones particulares, el marcador genético es NN0226631 o NN0246425. Además, en tales realizaciones, el ensayo de las plantas de pepino comprende PCR, análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla, electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante, análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de escisión, ensayo TAQMAN y/o secuenciación de ADN.

En otro aspecto, la invención proporciona una sonda o cebador de ácido nucleico aislado que hibrida en condiciones de 5 X SSC, formamida al 50% y 42 °C con una región genómica de la planta de pepino que se mapea dentro de 40 cM de un QTL que confiere resistencia al Moho Velloso y comprende una secuencia que se mapea en los cromosomas 2, 4 o 5 del pepino, en la que la sonda o cebador consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 20-51, 56-72, 75-77 y 79-87.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** representa un mapa genético (izquierda) y un diagrama de LOD (derecha) para los efectos del marcador sobre la reacción del Moho Velloso 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 en el mapa y la puntuación LOD. Este grupo de enlace se mapea al cromosoma 5 como se divulga, por ejemplo, en Ren et al., 2009 (PLoS ONE 4: e5795, 2009; doi: 10.1371/journal.pone.0005795). Otros ejemplos de mapas genéticos de pepino se proporcionan, por ejemplo, en Staub, et al., 2007 (HortScience, 40: 20-27), y Meboah et al., 2007 (Afr. J. Biotechnol. 6: 2784-2791).

La **Figura 2** representa los datos de resistencia del Moho Velloso para ciertos marcadores adicionales en una región de QTL que contribuye a la resistencia del Moho Velloso identificado, mostrando la correlación entre la resistencia al DM y la posición del marcador.

La **Figura 3** representa reacciones de enfermedad típicas para (A) PI 197088; (B) cv. Adefem; y (C) cv. Maram.

La **Figura 4** representa reacciones típicas de la enfermedad en hojas maduras que representan la escala de clasificación de la enfermedad descrita en el Ejemplo 6, el que "1" es más resistente y "9" es más susceptible.

La **Figura 5** representa mapas genéticos de los cromosomas 5, 4 y 2 del pepino con numerosos marcadores SNP ("NNO ..."), así como marcadores RAPD o CAPS previamente utilizados tales como CAPS_ENK59. El número a la izquierda de cada cromosoma esquemático representa la distancia genética en cM desde la "parte superior" del mapa. Las ubicaciones de los marcadores se presentan a la derecha de cada diagrama. Las flechas gruesas de dos lados a la derecha de los marcadores designados representan la ubicación aproximada del QTL 1, 2 y 4. (A) Cromosoma 5 de la población de mapeo API; (B) Cromosoma 5 de la población de mapeo VJ; (C) Cromosoma 4 de la población de mapeo API; (D) Cromosoma 4 de la población de mapeo VJ; (E) Cromosoma 2 de la población de mapeo API; (F) Cromosoma 2 de la población de mapeo VJ.

La **Figura 6**. Mapeo de intervalos y puntuaciones de LOD para QTL de los cromosomas 2, 4 y 5, analizados en las generaciones F4 y F5 de la población de mapeo QIR. Se muestran las puntuaciones LOD del análisis de mapeo QTL único para fenotipos recolectados de las generaciones F4 (línea continua) y F5 (línea de puntos) de la población de mapeo QIR. Las dos líneas horizontales indican los umbrales de permutación $\alpha = 0,05$ de 1.000 permutaciones para los dos conjuntos de datos. "Crom" se refiere al cromosoma.

La **Figura 7**. Las gráficas de las puntuaciones de las pruebas de patogenicidad del Moho Velloso F4 y F5 en la población de mapeo QIR, significa contra genotipos en los QTL correspondientes. El QTL identificado a partir de los datos de F4 estaba en Crom5: 55,5 cM y el QTL identificado a partir de los datos de F5 estaba en Crom4: 69,8 cM. Las barras de error se mapean a ± 1 error estándar.

La **Figura 8**. Gráficos de interacción entre los dos QTL para la resistencia al Moho Velloso en la población QIR. En cada gráfico, los tres genotipos en el eje x se mapean al QTL identificado utilizando los conjuntos de datos correspondientes. Los tres genotipos (AA, AB y BB) del QTL alternativo se indican mediante líneas continuas, discontinuas o punteadas, respectivamente. Las barras de error se mapean a ± 1 error estándar.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se divulgan procedimientos para identificar plantas de pepino (*Cucumis sativus*) que tienen resistencia al Moho Velloso (DM) causada por *Pseudoperonospora cubensis*. Tales líneas de pepino pueden denominarse variedades de pepino resistentes al DM. Se divulgan adicionalmente los procedimientos de reproducción de líneas 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. 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. En particular, los procedimientos se pueden realizar en plantas de pepino de progenie de la línea de pepino PI197088, tales como miembros de las poblaciones de mapeo API, VJ o QIR divulgadas en este documento, o su progenie. Los QTL identificados de esta manera pueden combinarse con uno o más QTL que también contribuyen a la resistencia al DM, según se desee. Además del QTL identificado en la Figura 1, que se mapea a "QTL 1" (localizado en el cromosoma 5: 25,3 - 82,1 cM como se identifica en las Figuras 5A-5B y la Tabla 19; o cromosoma 5: 25,2 - 78,3 cM, o cromosoma 5: 28,5- 75,0 cM), otro QTL principal (denominado "QTL 2") se identificó en las poblaciones de mapeo API, VJ o QIR, en el cromosoma 4: 20,6- 87,4 cM (véanse las Figuras 5C-5D y la Tabla 19; o el cromosoma 4: 25,8- 82,0 cM; o cromosoma 4: 31,8 - 75,8 cM), que también tiene un efecto significativo sobre la resistencia al Moho Velloso en el pepino. Individualmente, se estima que cada alelo de estos dos QTL tiene el potencial de reducir significativamente la calificación de la enfermedad del Moho Velloso de una planta en una prueba de patología de DM como se divulga en el presente documento, por ejemplo, en los antecedentes genéticos de población de mapeo API y VJ, cuando se cultiva en ubicaciones geográficas probadas en forma múltiple. Un mapeo adicional de QTL ("QTL 4"; véanse las

Figuras 5E-5F) al cromosoma 2: 22,3 - 88,4 cM también tiene un efecto en la resistencia al Moho Velloso del pepino, aunque su efecto genético es aparentemente más complejo, con posibles interacciones con otros QTL y/o el entorno de crecimiento.

5 Los efectos alélicos aditivos individuales promedio se estiman en 0,62 (0,32 - 1,26) en QTL 1 y 0,62 (0,47 - 0,93) en QTL 2, a partir de los estudios divulgados en el Ejemplo 8. Efectos alélicos de aproximadamente 0,7 unidades de puntuación de enfermedad en cada uno de QTL1 y QTL2 de los cromosomas 4 y 5 se observaron en la población de mapeo QIR. Por lo tanto, es probable que una planta individual con ambos alelos resistentes en ambos QTL tenga una reducción en la calificación de la enfermedad de $0,62 \times 2 + 0,62 \times 2 = 2,48$. Individualmente, la cantidad promedio de variación fenotípica explicada por cada uno de estos dos QTL es 24% (QTL 1) y 21% (QTL 2), con el 76% - 79% restante atribuible a otros efectos genéticos y efectos ambientales (no genéticos).

15 La definición de estos QTL permite el uso de marcadores moleculares específicos, tal como los divulgados en este documento, en un programa de fitomejoramiento para la introgresión de un rasgo o rasgos de resistencia al Moho Velloso en líneas de pepino agrónomicamente aceptables. La introgresión asistida por marcadores implica la transferencia de una región cromosómica, definida por uno o más marcadores, de un germoplasma a un segundo germoplasma. Una etapa inicial en ese proceso es la localización del rasgo mediante el mapeo de genes, que es el proceso de determinar la posición de un gen en relación con otros genes y marcadores genéticos a través del análisis de enlaces. El principio básico para el mapeo de enlaces es que cuanto más cerca estén dos genes en el cromosoma, más probabilidades hay de que se hereden juntos. Brevemente, se realiza un cruce entre dos progenitores genéticamente compatibles pero divergentes en relación con un rasgo en estudio (por ejemplo, resistencia al DM). Los marcadores genéticos se utilizan para seguir la segregación de los rasgos en estudio en la progenie del cruce, a menudo denominada "población de mapeo". La divulgación actual se refiere a la introgresión en el pepino de material genético, por ejemplo, mapeo a uno o más QTL, que es capaz de hacer que una planta sea más resistente al patógeno que causa la enfermedad de Moho Velloso en el pepino. Los presentes inventores han identificado regiones cromosómicas responsables de la resistencia mejorada al DM y han utilizado la reproducción asistida por marcadores para la introgresión de estos bloques de enlace específicos en otro germoplasma de pepino que carece de tal resistencia al DM. Tal proceso para producir la planta o línea de pepino resistente al DM comprende la introgresión de al menos un mapeo de locus cromosómico a QTL 1, QTL 2 y/o QTL 4 desde una planta, línea o variedad de pepino más resistente al DM en una planta, línea o variedad de pepino menos resistente al DM. En particular, la planta, línea o variedad de pepino más resistente al DM puede ser PI197088, o una planta de la progenie de la misma.

35 La introgresión de un elemento de ADN particular o conjunto de elementos en un genotipo de planta se define como el resultado del proceso de conversión de retrocruzamiento. Un genotipo de planta en el que se ha hecho introgresión de una secuencia de ADN puede denominarse genotipo, línea o variedad convertida por retrocruzamiento. Tal genotipo, línea o variedad puede ser un genotipo, línea o variedad endogámica o híbrida. De manera similar, un genotipo de planta que carece de dicha secuencia de ADN deseada puede denominarse genotipo, línea o variedad no convertida. Durante la reproducción, los marcadores genéticos vinculados a una mayor resistencia al DM pueden usarse para ayudar a la reproducción con el propósito de producir plantas de pepino con mayor resistencia a *Pseudoperonospora cubensis*. Un trabajador experto comprenderá que la introgresión de un rasgo de resistencia al DM en una planta de pepino puede controlarse mediante pistas visuales, tales como mediante el uso de una prueba de resistencia a enfermedades con una escala de clasificación de enfermedades como se divulga en este documento, y/o monitoreando y mejorando la presencia de marcadores moleculares como se divulga en el presente documento (es decir, selección asistida por marcadores).

50 La localización de dichos marcadores en regiones genómicas específicas o contiguas permite además el uso de secuencias asociadas en la reproducción, para desarrollar marcadores genéticos vinculados adicionales, así como para identificar el mecanismo de resistencia a niveles genéticos y bioquímicos más precisos. Los expertos en la materia entenderán que otros marcadores o sondas que mapean más de cerca las regiones cromosómicas como se identifica en este documento podrían emplearse para identificar plantas que comprenden un QTL deseado para resistencia al DM. Las regiones cromosómicas divulgadas en la presente memoria facilitan la introgresión de una mayor resistencia al DM del germoplasma resistente al DM, tal como PI197088 o la progenie del mismo, en otro germoplasma, preferiblemente germoplasma de pepino agrónomicamente útil. Los bloques de enlace de varios tamaños pueden transferirse siempre que la región cromosómica mejore la resistencia al DM de una planta, línea o variedad de pepino deseable. Por consiguiente, se enfatiza que se pueden usar marcadores moleculares que mapeen genéticamente en regiones similares, siempre que los marcadores sean polimórficos entre los progenitores.

60 En particular, estos marcadores pueden estar genéticamente unidos a los QTL descritos para la resistencia al DM que se encuentran en los cromosomas 2, 4 o 5 del pepino, por ejemplo, como se define en el mapa genético de Ren et al., (PLoS ONE 4: e5795, 2009; doi: 10.1371/journal.pone.0005795). En particular, los marcadores pueden estar dentro de 50 cM, 45 cM, 40 cM, 30 cM, 20 cM, 10 cM, 5 cM, 3 cM, 1 cM o menos, del QTL 1 definido en el cromosoma 5, en 22,6 - 81,0 cm; o QTL 2 definido en el cromosoma 4 en 37,7 - 87,6 cM; o QTL 4 definido en el cromosoma 2 en 21,8 - 73,8 cM, basado en el análisis de las poblaciones de mapeo API y VJ como se divulga en el presente documento. En particular, los marcadores utilizados para seguir la presencia de cualquiera de estos QTL para resistencia al DM que se encuentran en los cromosomas 5, 4 o 2 del pepino, pueden seleccionarse del grupo

que consiste en: NN0223782, NN0225385, NN0226670, NN0224124, NN0246472, NN0225358, NN0227700, NN0224617, NN0247695, NN0227242, NN0223824, NN0223181, NN0226638, NN0225012, NN0228579, NN0226451, NN0225088, NN0226219, NN0247551, NN0246357, NN0225551, NN0226732, NN0247689, NN0247342, NN0224702, NN0225482, NN0224538, NN0247543, NN0224041, NN0228853, NN0227762, NN0227587, NN0228457, NN0246356, NN0246332, NN0223399, NN0223689, NN0247731, NN0226166, NN0225480, NN0246411, NN0227759, NN0247348, NN0228465, NN0247786, NN0226645, NN0223809, NN0227071, NN0226870, NN0228148, NN0246378, NN0224041, NN0227587, NN5096749, NN0224856, NN0223160, NN0223809, NN0226631, NN0227981, NN0247786, NN0246425, NN0224495, NN0225088, NN0227071, NN0223782, NN0228579, NN0247342 y NN0247731, que comprende un polimorfismo de un solo nucleótido de una de las SEQ ID NOs: 20-87 como se muestra en las Tablas 13 y 22, y UBC12-1200 y CAPs_ENK59, u otros marcadores genéticos vinculados a cualquiera de estos QTL. La presencia de alelos que confieren resistencia al DM puede identificarse mediante el uso de técnicas bien conocidas, tales como procedimientos de detección de ácido nucleico que utilizan sondas o cebadores que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-87. En ciertos aspectos de la divulgación, el procedimiento comprende detectar la presencia de uno o más polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) presentados en una o más de las SEQ ID NO: 20-87.

En particular, el QTL de resistencia al DM del cromosoma 2 se define como la que abarca la región definida por el marcador de SNP NN0223782 (posición en el mapa 22,5 de acuerdo con la Tabla 19), al marcador de SNP NN0226638 (posición en el mapa 88,4). Además, el QTL de resistencia al DM del cromosoma 2 se define como la que abarca la región definida por el marcador de SNP NN0246378 (posición en el mapa ~14,6 de acuerdo con las Tablas 19 o 22), al marcador de SNP NN0246472 (posición en el mapa 38,4 de acuerdo con la Tabla 19).

En particular, el QTL de resistencia al DM del cromosoma 4 se define como la que abarca la región definida por el marcador de SNP NN0225012 (posición en el mapa 20,6), al marcador de SNP NN0227587 (posición en el mapa 87,4). Además, el QTL de resistencia al DM del cromosoma 4 se define como la que abarca la región definida por el marcador de SNP NN0225088 (posición en el mapa 30,4) al marcador de SNP NN0224041 (posición en el mapa 75,8). Aún más, el QTL de resistencia al DM del cromosoma 4 se define como la que abarca la región definida por el marcador de SNP NN0228579 (posición en el mapa 25,8), al marcador de SNP NN0224495 (posición en el mapa 82,0).

En particular, el QTL de resistencia al DM del cromosoma 5 se define como la que abarca la región definida por el marcador de SNP NN0228457 (posición en el mapa 25,2), al marcador de SNP NN0228148 (posición en el mapa 82,7), como se enumera en las Tablas 13 y 19. Además, el QTL de resistencia al DM del cromosoma 5 se define como la que abarca la región definida por el marcador de SNP NN0224856 (posición en el mapa 28,5) al marcador de SNP NN0223160 (posición en el mapa 75,0). Aún más, el QTL de resistencia al DM del cromosoma 5 se define como la que abarca la región definida por el marcador de SNP NN5096749 (posición en el mapa 25,2), al marcador de SNP NN0227071 (posición en el mapa 78,3).

El QTL 1 también se ha definido en una población de mapeo basada en un cruce de líneas de pepino Lucinde y PI197088, como localizada entre los marcadores genéticos ENK59 y CAPs_17563/66, en aproximadamente 5 cM - 39 cM en el grupo de enlace, y como definido por el análisis de esa población de mapeo (por ejemplo, véase la Figura 1). Además, un experto en la materia comprenderá que la asignación de tales posiciones en el mapa genético puede verse afectada por la población de mapeo que se analiza, incluidas, por ejemplo, las líneas parentales utilizadas, la densidad del marcador y el tamaño de la población, cada uno de los cuales puede afectar el nivel de recombinación que se observa y, por lo tanto, la posición asignada del mapa genético. Se puede utilizar un mapa genético y físico integrado para definir la posición de un QTL de pepino, tal como el proporcionado por Ren et al., 2009, por ejemplo, en relación con marcadores con posiciones conocidas del mapa genético y/o físico.

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

Las plantas de pepino resistentes al DM pueden tener hojas grandes que forman un dosel sobre la fruta. La vid 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 amarillo a marrón. 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 ancho, y generalmente son simples, alternas, palmeadas y lobuladas.

La fruta madura de las plantas de pepino resistentes al DM de la presente divulgación 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 recto o curvo, y generalmente tiene una longitud de 25-30 cm en la madurez de la cosecha,

aunque la fruta puede ser comestible a los 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 amargo.

5 Como se usa en el presente documento, una "planta de pepino de control susceptible" se refiere a una planta de pepino susceptible a Moho Velloso (susceptible a DM) que incluye parientes silvestres y comercialmente disponibles de plantas de pepino modernas. En un aspecto, la planta de pepino de control es la variedad MARAM, SMR58, CORONA o SPRINT 440. También se puede utilizar una "planta de pepino de control resistente" al evaluar variedades de pepino resistentes al DM. Tal control puede ser una planta de pepino que no es susceptible al DM, pero que de otra manera 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 al DM pueden ser DMP21, GP14, LLP-1, ADEFEM, SWEETSLICE o POINSETT 76. Como se divulga en el presente documento, una línea de pepino de control se cultiva bajo condiciones ambientales similares a las de la línea de pepino comparativa, de acuerdo con la presente divulgación.

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

20 Como se usa en el presente documento, un "progenitor femenino" se refiere a una planta de pepino que es receptora de 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 estériles masculinos, 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 génica o citoplasmática se puede manifestar de diferentes maneras, tales como el polen estéril, las flores malformadas o sin estambre, la esterilidad posicional y la esterilidad funcional.

25 Como se usa en el presente documento, "esterilidad masculina citoplasmática" se refiere a plantas que normalmente no pueden reproducirse por autopolinización, pero que pueden reproducirse por polinización cruzada.

30 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.

35 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 o inserciones/supresión o supresiones ("INDEL"), repeticiones entre secuencias simples (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 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. Las condiciones rigurosas para la hibridación de una sonda o cebador de ácido nucleico a una secuencia marcadora o una secuencia que flanquea una secuencia marcadora se refieren, por ejemplo, a condiciones de hibridación de ácido nucleico de 5 X SSC, formamida al 50% y 42 °C. Como se usa en el presente documento, "ensayo de marcador" significa un procedimiento para detectar un polimorfismo en un locus particular usando un procedimiento particular, por ejemplo, medición de al menos un fenotipo (tal como un rasgo detectable visualmente, incluida la resistencia a la enfermedad), polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), extensión de base única, electroforesis, alineación de secuencias, hibridación oligonucleotídica específica alélica (ASO), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), tecnologías basadas en microarreglos, tecnologías basadas en PCR y tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos.

40 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 fruta de pepino, por ejemplo, tal como lo muestran las líneas o variedades de cultivo agronómicamente de élite, y que pueden seleccionarse independientemente incluyen: tamaño de la fruta, forma, color, apariencia de la superficie; número de semilla, tamaño de semilla, número de lóculo; espesor y tenacidad del pericarpio; sabor, amargura, presencia de tubérculos y vida útil. Los rasgos deseables de la planta de pepino, por ejemplo, tal como lo muestran las líneas o variedades de cultivo agronómicamente de élite, y 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 está determinada o no, tiempo de madurez, adaptación al crecimiento en el campo, adaptación al crecimiento en invernadero y a la resistencia a una o más enfermedades u organismos que causan enfermedades tales como la Marchitamiento por *Verticillium*, nematodos del nudo de la raíz, Virus del Mosaico del Tabaco, costra del pepino, antracnosis tipo 1, moho pulverulento (por ejemplo, causado por *Erysiphe*

cichoracearum o *Sphaerotheca fuliginea*), Corinesporiosis, Virus del Mosaico del Pepino y Marchitamiento por Fusarium. Cualquier combinación de rasgos deseables de frutas de pepino, rasgos de plantas de pepino o rasgos de plantas y frutas de pepino se puede combinar con un rasgo de resistencia al DM. Las plantas de pepino resultantes resistentes al DM agronómicamente de élite sorprendentemente muestran tales rasgos agronómicos en combinación con la resistencia al DM, a la vez que carecen de rasgos perjudiciales.

Como se usa en este documento, "polimorfismo" significa la presencia de una o más variaciones de una secuencia de ácido nucleico en uno o más loci en una población de uno o más individuos. La variación puede comprender uno o más cambios de base, la inserción de uno o más nucleótidos o la supresión de uno o más nucleótidos. Un polimorfismo puede surgir de procesos aleatorios en la replicación de ácidos nucleicos, a través de mutagénesis, como resultado de elementos genómicos móviles, de la variación del número de copias y durante el proceso de meiosis, tal como el cruce desigual, la duplicación del genoma y las rupturas y fusiones de cromosomas. La variación se puede encontrar comúnmente, o puede existir a baja frecuencia dentro de una población, la primera tiene una mayor utilidad en el fitomejoramiento general y la segunda puede estar asociada con una variación fenotípica rara pero importante. Los polimorfismos útiles pueden incluir polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), inserciones o supresiones en la secuencia de ADN (Indels), repeticiones de secuencia simple de una secuencia de ADN (SSR), un polimorfismo de longitud de fragmento de restricción y una etiqueta SNP. Un marcador genético, un gen, una secuencia derivada de ADN, un haplotipo, una secuencia derivada de ARN, un promotor, una región no traducida 5' de un gen, una región no traducida 3' de un gen, microARN, ARNip, un QTL, un marcador satélite, un transgén, ARNm, ARNbc, un perfil transcripcional y un patrón de metilación pueden comprender polimorfismos. Además, la presencia, ausencia o variación en el número de copias de lo anterior puede comprender un polimorfismo.

Como se usa en el presente documento, "genotipo" es la secuencia de ácido nucleico real en un locus en una planta individual. Como se usa en el presente documento, "fenotipo" significa las características detectables (por ejemplo, nivel de resistencia al DM) de una célula u organismo que pueden ser influenciadas por el genotipo.

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.

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

La resistencia al DM puede determinarse adicionalmente obteniendo clasificaciones de enfermedad del desarrollo de síntomas después de una o más rondas de inoculación o infección con DM en hojas de pepino y/o cotiledones.

La resistencia en una prueba de hoja se puede calificar en un ejemplo de escala de la siguiente manera:

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	Gran clorosis angular en expansión con lesiones necróticas limitadas
5	Gran clorosis angular en expansión con lesiones necróticas en expansión

Las pruebas se evalúan una vez que se han desarrollado los síntomas en los controles susceptibles (por ejemplo, variedades de cultivo Maram o SMR58). PI 197088 puede usarse como control de "resistencia"; y la variedad de cultivo Poinsett 76 u otra variedad de cultivo que exhibe un nivel comparable de resistencia al Moho Velloso puede usarse 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 intervalos del índice de enfermedad para las categorías "Resistente", "Resistente intermedio" y "Susceptible". Las variedades generalmente se prueban varias veces antes de que se haga una determinación final del nivel de resistencia a la enfermedad. Las puntuaciones 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. Una puntuación de 4-5 indica una planta susceptible. Las puntuaciones en esta escala 1-5 se correlacionarían con una escala 1-9 en la que 1 = 1, 2 = 3, 3 = 5, 4 = 7 y 5 = 9. El grado de resistencia también puede evaluarse mediante una escala de calificación alternativa, por ejemplo, como se divulga en el Ejemplo 6.

Una planta puede analizarse para determinar la resistencia al DM, resistencia parcial o susceptibilidad mediante análisis de imagen de tejido foliar usando aproximadamente 3 hojas por planta capturadas en una imagen digital. El análisis de imagen 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" está entre aproximadamente 1% y 20% del área de la hoja que tiene síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas; "sustancialmente resistente" está entre aproximadamente 20% y 30% del área de la hoja que tiene síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas; "resistencia media" está entre 40% y 50% del área de la hoja que tiene síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas; "parcialmente resistente" es menor o igual a aproximadamente el 50% del área de la hoja que tiene síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas; "susceptibilidad media" está entre aproximadamente 50% y 60% del área de la hoja que tiene síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas; y "susceptible" está entre aproximadamente 60% y 100% del área de la hoja que tiene síntomas de lesiones cloróticas y/o necróticas. Una planta resistente puede caracterizarse como se establece en este documento, o mediante el uso de otros medios, tales como PCR cuantitativa para determinar el nivel de infección.

Las líneas de pepino que tienen resistencia al DM, o resistencia parcial, 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 blandos, mosaico, venas cloróticas, manchas foliares cloróticas, mosaico clorótico y/o verde claro en las hojas, lesiones de frutas o combinaciones de las mismas. 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. Además, 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. Finalmente, la planta de pepino pertenece a una variedad o variedad cultivada de pepino, y en otro aspecto, la planta de pepino es una planta de pepino endogámica.

Las plantas y variedades de pepino divulgadas en este documento demuestran pocos o ningún síntoma de lesiones cloróticas y/o necróticas después de la inoculación o infección con DM. En algunos aspectos, una planta de pepino resistente al DM muestra 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 de pepino.

Las plantas de pepino resistentes al 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. En particular, las plantas de pepino resistentes al DM pueden exhibir 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 de pepino de control. Además, las plantas de pepino resistentes al 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. Además, los síntomas de la enfermedad se pueden medir en cualquier momento después de la exposición patogénica de una planta de pepino. Además, los síntomas se pueden medir 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. Finalmente, la planta de pepino puede ser de cualquier edad en el momento de la inoculación o infección.

Además, los síntomas de la enfermedad pueden observarse después de la exposición al 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 la 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 adicionalmente plantas de pepino que exhiben resistencia a una o más clases de DM. En particular, las plantas de pepino pueden exhibir resistencia a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más clases de DM.

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

Las plantas de pepino divulgadas en el presente documento pueden ser líneas de pepino adaptadas para la producción de pepino de invernadero o para la producción de pepino de campo. Dichas plantas de pepino pueden adaptarse para la producción de pepino de invernadero.

- 5 También se divulga un pepino híbrido que tiene resistencia al DM. En particular, se divulga un pepino híbrido que muestra resistencia al DM después de la inoculación o infección con DM.

10 En el presente documento se divulgan 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, tal como el conservado en vinagre. En el presente documento se divulga una planta de pepino que produce una fruta de pepino que tiene una longitud de aproximadamente 11, 12, 13 o 14 cm. Tal planta de pepino 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 Una planta de pepino de este tipo puede producir una fruta de pepino que tiene un peso en la cosecha de aproximadamente o superior a 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120 y 125 gramos. Además, dicha planta de pepino 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 la fruta de pepino individual en una balanza.

20 La fruta madura de pepino producida por plantas resistentes al DM puede tener un diámetro de 10, 11, 12, 13 o 14 mm o más. En algunas realizaciones, 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 la fruta de pepino tal como la forma, peso o tamaño puede medirse o evaluarse en una variedad de momentos. En particular, un atributo puede medirse después del crecimiento en una cámara de crecimiento. Alternativamente, se puede medir un atributo en el momento de la cosecha. Además, se puede medir un atributo 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 En particular, una fruta de pepino de una planta de pepino que tiene resistencia al DM puede tener una calificación general de calidad de fruta de 1, 3, 5, 7 o 9, en la que la calidad de la fruta se mide mediante inspección visual, con una escala que varía de 1 = excelente hasta 9 = pobre: Calificación 1 = Excelente; 3 = por encima del promedio; 5 = promedio; 7 = por debajo del promedio; 9 = pobre; en comparación con los híbridos comerciales estándar cultivados en la zona. La calidad de la fruta se relaciona con el color, la forma, la longitud y el diámetro de la fruta.

35 Se divulgan adicionalmente cultivos de tejidos de las plantas de pepino descritas en el presente 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 las 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, tales como embrión, hoja, pedúnculo, pedicelo, antera, meristemo, punta y segmentos de la raíz, muñón y tallo y explantes. 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 en, por ejemplo, Fillatti et al., 1987 (BiolTechnology, 5: 726-730). Además, el cultivo de tejidos de las plantas de pepino descrito 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 al DM descritas en el presente documento. El cultivo de tejidos se refiere 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 al 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 al DM, incluidas aquellas producidas por cruces o retrocruces, como se enumeran en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 12/424.452, publicada como US 2009-0265803. Se han depositado muestras representativas de semillas de dichas líneas bajo la ATCC número de acceso PTA-9375, ATCC número de acceso PTA-8930, ATCC número de acceso PTA-8931, ATCC número de acceso PTA-8953, ATCC número de acceso PTA-8954 y su progenie resistente al DM, como se enumera en la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2009-0265803.

60 Un 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 al DM descritas en el presente documento.

65

- Una vez que se producen plantas resistentes al DM, las propias plantas se pueden variedad de cultivo de acuerdo con procedimientos convencionales. La progenie resistente al 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 variedad de cultivo como medio de propagación. La progenie resistente al DM también se puede obtener de plantas resistentes al DM a través de la reproducción asexual. Los protoplastos o propágulos (por ejemplo, esquejes, vástagos o rizoma) pueden recuperarse de plantas resistentes al DM o partes de las mismas y pueden emplearse para propagar plantas resistentes al DM.
- También se divulga un contenedor de semillas de pepino en el 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 tienen resistencia al DM. También se divulgan semillas de una planta de pepino 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, y su progenie resistente al DM, en el 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 recipiente puede contener aproximadamente, o más de aproximadamente, 1 g, 5, 10, 15, 25, 100, 250, 500 o 1.000 g de semillas. Alternativamente, el contenedor puede contener aproximadamente 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, 3,63, 4,54 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 empaque, un costal, un rollo de cinta, un papel de aluminio, un cubo o un tubo.
- 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. Además se divulga una vid de pepino que tiene fruta de pepino de una planta que tiene resistencia al DM.
- También se divulgan frutas de pepino secas o bien procesadas, producidas 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 guisados, fruta de pepino en lata, en vinagre, picada, en rodajas o triturada. En particular, la fruta de pepino seca, encurtida o procesada de otro modo, puede ser la fruta de una planta de pepino de una línea 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 endogámica que tiene resistencia al DM, en la que la resistencia se exhibe cuando la planta está en contacto con el DM. La planta de pepino endogámica puede derivarse del acceso P1197088.
- Además, se incluyen plantas de *C. sativus* que tienen al menos un alelo para un rasgo de resistencia al DM. Las plantas de pepino resistentes al DM pueden ser heterocigotas u homocigotas para el rasgo de resistencia al DM. El rasgo resistente al DM puede estar vinculado a variaciones en un solo gen (por ejemplo, vinculado a uno o más alelos de un solo gen). Alternativamente, el rasgo de resistencia al DM puede estar vinculado a variaciones en uno o uno o más loci de rasgos cuantitativos (QTL). Además, las plantas de pepino resistentes al DM pueden ser homocigotas para el rasgo de resistencia al 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 diferente a *C. sativus*. En particular, la planta de pepino resistente al DM puede seleccionarse 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 al DM. El locus genético derivado de una planta de pepino resistente al DM se puede identificar 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 resistente al DM resistente al *C. sativus*. En particular, una planta de pepino *C. sativus* resistente al DM puede tener un 50%, 25%, 12,5%, 6%, 3% o menos de ADN nuclear derivado de una planta diferente de *C. sativus* resistente al DM. Tal planta de pepino *C. sativus* resistente al DM puede tener un 50%, 25%, 12,5%, 6% o 3% o menos de ADN nuclear derivado de otro miembro del género *Cucumis* que sea resistente al DM.
- También se divulga la progenie de plantas de pepino que tienen resistencia al DM. Como se usa en este documento, la progenie incluye no solo los productos de cualquier cruce (ya sea un retrocruzamiento 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 nuclear de una planta de pepino resistente al DM y expresa el material genético que proporciona resistencia al DM. Las poblaciones representativas de plantas de pepino que comprenden la progenie que tiene resistencia al DM incluyen la progenie del cruce de los progenitores susceptibles de la variedad de cultivo Lucinde x PI197088, así como las poblaciones API y VJ, generadas al cruzar cada uno de los dos progenitores susceptibles (API-45-5312-MO y VJ03-68-06) por la misma línea resistente (PI197088).

También se divulga una planta de pepino resistente al DM que contiene un marcador genético unido a uno o más lugares de resistencia al DM. Por "locus de resistencia al DM" se entiende un locus que contribuye a la resistencia al DM ya sea sola o en combinación con uno o más locus de resistencia al DM. Por "contribuye a la resistencia al Moho Velloso" se entiende que el grado de resistencia al Moho Velloso aumenta en la planta correspondiente, ya sea cuando el locus está solo o en combinación con uno o más locus.

En particular, un marcador vinculado a uno o más loci de resistencia al DM puede incluir uno o más de los siguientes: CAPs_21826, CAPs_ENK60, CAPs_ENK59, CAPs_17170, CAPs_17179, CAPs_18229 CAPs_17563/66 y CAPs_ENK70. Además, los marcadores analizados vinculados a uno o más loci de resistencia al DM pueden incluir cada uno de los siguientes: CAPs_ENK60, CAPs_17170 y CAPs_17563/66. Además, el marcador o marcadores vinculados a uno o más loci de resistencia al DM pueden incluir uno o más marcadores de SNP seleccionados del grupo que consiste en: NN0223782, NN0225385, NN0226670, NN0224124, NN0246472, NN0225358, NN0227700, NN0224617, NN0247695, NN0227242, NN0223824, NN0223181, NN0226638, NN0225012, NN0228579, NN0226451, NN0225088, NN0226219, NN0247551, NN0246357, NN0225551, NN0226732, NN0247689, NN0247342, NN0224702, NN0225482, NN0224538, NN0247543, NN0224041, NN0228853, NN0227762, NN0227587, NN0228457, NN0246356, NN0246332, NN0223399, NN0223689, NN0247731, NN0226166, NN0225480, NN0246411, NN0227759, NN0247348, NN0228465, NN0247786, NN0226645, NN0223809, NN0227071, NN0226870, NN0228148, NN0246378, NN0224041, NN0227587, NN5096749, NN0224856, NN0223160, NN0223809, NN0226631, NN0227981, NN0247786, NN0246425, NN0224495, NN0225088, NN0227071, NN0223782, NN0228579, NN0247342, y NN0247731, que comprenden un polimorfismo de un solo nucleótido de una de las SEQ ID NOS: 20-87.

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 al DM, puede ser genético o físico o ambos. El marcador de ácido nucleico y el locus genético que confieren resistencia al DM pueden estar genéticamente unidos, 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 basado 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). Alternativamente, se puede utilizar otro software como QTL Cartographer v1.17 (Basten et al., *Zmap-a QTL cartographer*. En: *Actas del 5º Congreso Mundial de Genética Aplicada a la Producción de Ganado: Estrategias de Computación y Software*, editado por C. Smith, JS Gavora, B. Benkel, J. Chesnais, W. Fairfull, JP Gibson, BW Kennedy y EB Burnside. Volumen 22, páginas 65-66. Comité Organizador, 5º Congreso Mundial de Genética Aplicada a la Producción de Ganado, Guelph, Ontario, Canadá, 1994; y Basten et al., *QTL Cartographer, Versión 1.17*. Departamento de Estadística, North Carolina State University, Raleigh, NC, 2004). El mapeo de los QTL está bien descrito (por ejemplo, el documento WO 90/04651; patentes de los Estados Unidos Nos. 5.492.547, 5.981.832, 6.455.758; revisado en Flint-García et al., 2003 (*Ann. Rev. Planta Biol.* 54: 357-374). Además, el marcador y la región que confieren resistencia al DM pueden estar genéticamente unidos y pueden exhibir una puntuación LOD mayor a 3,0, o una puntuación LOD mayor a 6,0; 9,0; 12,0; 15,0 o 18,0. El marcador y la región que contribuyen a la resistencia al DM pueden estar genéticamente vinculados y pueden exhibir una puntuación LOD de entre aproximadamente 14 y aproximadamente 20. Al asignar la presencia de un QTL, la puntuación de umbral de LOD asociado con un análisis de QTL como se describe en el presente documento puede determinarse como significativo al nivel de confianza del 95%, o superior, tal como al nivel de confianza del 98% o 99%.

El marcador de ácido nucleico puede estar genéticamente unido a una distancia de entre 0 y 50 centimorgans (cM) al locus de resistencia al DM. En particular, la distancia entre el marcador de ácido nucleico y el locus de resistencia al DM está 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.

También se divulga una planta de pepino que comprende una región cromosómica introgresada del cromosoma 2 de PI197088 o una planta de la progenie de la misma de 20 cM, 10 cM, 5 cM o 1 cM dentro de la región definida como la que abarca las posiciones del marcador de SNP NN0246378 y del marcador de SNP NN0246472; o el marcador de SNP NN0246378 y el marcador de SNP NN0247695. Además, se divulga una planta de pepino que comprende una región cromosómica introgresada del cromosoma 4 de PI197088 o una planta de la progenie de la misma, de 20 cM, 10 cM, 5 cM o 1 cM dentro de la región definida como la que abarca las posiciones del marcador de SNP NN0225012 y el marcador de SNP NN0227587; o el marcador de SNP NN0228579 y marcador de SNP NN0224495; o marcador de SNP NN0225088 y marcador de SNP NN0224041. Además, se divulga una planta de pepino que comprende una región cromosómica introgresada del cromosoma 5 de PI197088 o una planta de la progenie de la misma, de 20 cM, 10 cM, 5 cM o 1 cM dentro de la región definida que abarca las posiciones del marcador de SNP NN5096749 y NN0227071; o el marcador de SNP NN5096749 y el marcador de SNP NN0223160; o el marcador de

SNP NN0224856 y el marcador de SNP NN0223160. Dicha planta de pepino puede comprender una región cromosómica introgresada del cromosoma 2 de PI197088 y una región cromosómica introgresada del cromosoma 4 o 5 de PI197088, en la que las regiones cromosómicas introgresadas permiten una mayor resistencia al DM, en relación con una línea de pepino isogénica que no comprende uno o más de las regiones introgresadas.

5 Además, la planta de pepino puede comprender una región cromosómica introgresada del cromosoma 4 de PI197088 y una región cromosómica introgresada del cromosoma 2 y/o 5 de PI197088, o una región introgresada del cromosoma 5 de PI197088 o una progenie del mismo, y una región cromosómica introgresada de los cromosomas 2 y/o 4 de PI197088 o una planta de la progenie de la misma, en la que la región o regiones cromosómicas introgresadas permiten una mayor resistencia al DM, en relación con una línea de pepino isogénica que no comprende una o más de las regiones introgresadas.

15 En particular, el fragmento cromosómico introgresado de PI197088 o una planta de la progenie de la misma, puede comprender una región cromosómica de aproximadamente 20 cM, 10 cM, 5 cM o 1 cM, y puede comprender además un alelo derivado de PI197088 en el marcador de SNP NN0226631 del cromosoma 5. Además, el fragmento cromosómico introgresado de PI197088 o una planta de la progenie de la misma, puede comprender una región cromosómica de aproximadamente 20 cM, 10 cM, 5 cM o 1 cM, y además puede comprender un alelo derivado de PI197088 en el marcador de SNP NN0246425 del cromosoma 4.

20 La secuencia marcadora de ácido nucleico puede estar físicamente unida a un locus de resistencia al DM. La secuencia de ácido nucleico del marcador genético hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que está dentro de aproximadamente 30 Mpb, o aproximadamente 20 Mpb, o aproximadamente 15 Mpb, o aproximadamente 10 Mpb, o aproximadamente 5 Mpb de un locus de resistencia al DM. La secuencia de ácido nucleico del marcador genético se hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-87, o un complemento de la misma.

30 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 rigurosidad convencionales son descritas por Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva 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 salinas empleadas.

40 Las condiciones de rigurosidad 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 técnica o se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3.1-6.3.6. En particular, las condiciones de hibridación pueden ser condiciones de rigurosidad alta, moderada o baja. Las condiciones preferidas incluyen aquellas que usan formamida al 50%, 5,0 X SSC, SDS al 1% e incubación a 42 °C durante 14 h, seguido de un lavado usando 0,2 X SSC, SDS al 1% e incubación a 65 °C.

45 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 rigurosidad baja de aproximadamente 2,0 X SSC a 50 °C a una rigurosidad moderada de aproximadamente 1,0 X SSC a 50 °C a una rigurosidad 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 rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, a condiciones de rigurosidad moderada a aproximadamente 50 °C, a condiciones de alta rigurosidad 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 particular, la etapa de lavado se puede realizar durante 5, 10, 15, 20, 25, 30 o más minutos. En otro aspecto, la etapa de lavado se realiza durante aproximadamente 20 minutos. Además, la etapa de lavado se puede repetir 1, 2, 3, 4 o más veces usando la concentración de sal, temperatura y tiempo seleccionados. La etapa de lavado puede repetirse dos veces.

55 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 combinados del marcador genético de los endogámicos parentales. Los procedimientos para predecir el rendimiento híbrido a partir de datos de marcadores genéticos se divulgan 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.

65 Se pueden utilizar marcadores adicionales, tales como SSR, marcadores AFLP, marcadores RFLP, marcadores RAPD, marcadores fenotípicos, SNP, marcadores isoenzimáticos o perfiles de transcripción de microarreglos que están genéticamente unidos o correlacionados con la resistencia al DM (Walton, Seed World 22 - 29 (julio de 1993);

Burow y Blake, *Molecula Dissection of Complex Traits*, 13-29, Eds. Paterson, CRC Press, Nueva York (1988)). Los procedimientos para aislar tales marcadores y diseñar sondas o cebadores útiles para seguir la presencia de tales marcadores son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los SSR específicos de locus pueden obtenerse seleccionando una biblioteca genómica de pepino para SSR, secuenciando clones "positivos", diseñando cebadores que flanquean las repeticiones y amplificando el ADN genómico con estos cebadores. Del mismo modo, los marcadores de SNP también se pueden identificar.

El enlace genético de las moléculas marcadoras con la resistencia al DM puede establecerse mediante un modelo de mapeo genético tal como, sin limitación, el modelo de marcador de flanqueo y el mapeo de intervalos, basado en los procedimientos de máxima probabilidad descritos por Lander y Botstein, 1989 (*Genetics*, 121: 185-199), e implementados en los paquetes de software MAPMAKER (Blancohead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA, EE. UU.) o QTL Cartographer (North Caroline State University, Centro de Investigación Bioinformática).

Se calcula una estimación de máxima probabilidad (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 impares (LOD) como: $LOD = \log_{10} (MLE \text{ para la presencia de un rasgo} / MLE \text{ dado que no hay rasgo vinculado})$.

La puntuación 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, digamos 95%, depende del número de marcadores y la longitud del genoma. Los gráficos que indican los umbrales de LD se exponen en Lander y Botstein (1989), y son descritos adicionalmente por Ars y Moreno-Gonzalez, *Planta Breeding*, Hayward, Bosemark, Romagosa (eds.) Chapman & Hall, Londres, páginas 314-331 (1993)) y van Ooijen (*Heredity* 83: 613-624, 1999).

La selección de mapeo apropiado o poblaciones de segregación 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 Planta Chromosomes. Chromosome Structure and Function: Impact on New Concepts*. JP Gustafson y R. Appels (eds.), Plenum Press, Nueva York, páginas 157-173 (1988)). Se debe considerar la fuente de los progenitores (adaptados frente a exóticos) utilizados en la población de mapeo. El emparejamiento de cromosomas y las tasas de recombinación se pueden alterar severamente (suprimir) en cruces anchos (adaptados x exóticos) y generalmente producen distancias de enlace muy reducidas. Los cruces anchos generalmente proporcionarán poblaciones segregantes con una variedad relativamente grande de polimorfismos en comparación con la progenie en un cruce estrecho (adaptado x adaptado).

Se recogen líneas de mejoramiento avanzadas de los programas de reproducción. Estas son probadas por su fenotipo (por ejemplo, sus reacciones de puntuación de enfermedad al DM), y genotipados para marcadores en los intervalos de QTL de DM. A partir de estos datos, el intervalo genético más pequeño se identifica dentro de cada QTL que contiene el alelo favorable del progenitor donante (DP) entre las líneas resistentes al DM. Se deduce que este intervalo es crítico para conferir resistencia al DM. Los intervalos genéticos candidatos asociados con la resistencia al DM se detectaron como regiones que mostraban una frecuencia mejorada del alelo favorable del donante de resistencia al DM PI197088 en relación con un conjunto inicial de muestras susceptibles al DM del mismo tipo de clasificación del germoplasma (GCT). Por ejemplo, se pueden hacer comparaciones entre endogámicos resistentes y susceptibles al DM dentro de un solo GCT y un solo programa de reproducción. Los cambios de frecuencia de alelos entre clases fenotípicas pueden detectarse calculando una puntuación de evaluación de enlace (LAS) como: $LAS = (Frecuencia \text{ de alelo favorable en muestras con fenotipo favorable}) \times (Frecuencia \text{ de alelo desfavorable en muestras con fenotipo desfavorable})$.

Como se usa en este documento, la progenie incluye no solo los productos de cualquier cruce (ya sea un retrocruzamiento 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 nuclear 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.

Además se incluye en el presente documento un complemento genético de las líneas de pepino descritas en el presente documento. 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 divulgadas en este documento y otro complemento genético haploide. Los medios para determinar dicho complemento genético son bien conocidos en la técnica.

Como se usa en este documento, la frase "complemento genético" significa un agregado de secuencias de nucleótidos, cuya expresión 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 genotipa 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 genotipado 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 homocigótica o heterocigótica. 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/supresión (INDEL), polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP), polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLP), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) e isozimas.

Se puede obtener información genética considerable de una población F_2 completamente clasificada usando 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 de hermanos después de que se produce la semilla híbrida. Por lo general, una sola planta F_1 se poliniza por sí misma o por hermanos para generar una población que se segrega por los genes nucleares codificados de una forma mendeliana (1:2:1).

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 autopolinizadas por retrocruzamiento) 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 a los costes y al tiempo involucrado en las pruebas de progenie. Las pruebas de progenie de individuos F_2 a menudo se usan en la construcción de mapas en las que el error está asociado con el fenotipo de una sola planta, o cuando el muestreo de las plantas para genotipado afecta la capacidad de realizar un fenotipado preciso, o cuando 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 autopolinizadas) se pueden usar en el mapeo de rasgos. La selección asistida por marcadores se puede aplicar a la progenie posterior basada en asociaciones de mapa de rasgos de marcador (F_2 , F_3), en las que el enlace no ha sido completamente disociado por eventos de recombinación (es decir, desequilibrio máximo).

Las líneas endogámicas recombinantes (RIL) (líneas genéticamente relacionadas; usualmente $> F_5$) pueden usarse como una población de mapeo. Las RIL pueden desarrollarse autopolinizando plantas F_2 , luego autopolinizando las plantas F_3 resultantes y repitiendo este proceso de autopolinización generacional, 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 de RIL proporcionan más información por individuo que cualquier tipo de marcador en poblaciones de retrocruzamiento (por ejemplo, Reiter et al., 1992; Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 89: 1477-1481). Sin embargo, a medida que la distancia entre los marcadores se hace más grande (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 retrocruzamiento pueden utilizarse como poblaciones de mapeo. Se puede crear una población de retrocruzamiento (BC) cruzando una F_1 con uno de sus progenitores. Por lo general, las poblaciones de retrocruzamiento 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 retrocruzamientos) mientras se agregan uno o algunos rasgos del segundo progenitor, que es a menudo denominado como el donante. Se puede hacer una serie de retrocruzamientos 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 porta cantidades variables o un mosaico de regiones genómicas del progenitor donante. Las poblaciones de retrocruzamiento 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. (EE. UU.) 89 : 1477-1481).

La información obtenida de las poblaciones de retrocruzamiento utilizando marcadores codominantes o dominantes es menor que la obtenida de las poblaciones F_2 completamente clasificadas debido a que los eventos de recombinación que involucran uno, en lugar de dos, gametos se muestrean por planta. Sin embargo, las poblaciones de retrocruzamiento 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 retrocruzamientos para producir una serie 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 de NIL altamente homocigota. Sin embargo, es probable que los loci que son polimórficos en una población de NIL estén vinculados al rasgo de interés.

El análisis segregante a granel (BSA) es un procedimiento desarrollado para la identificación rápida de enlaces entre marcadores y rasgos de interés (Michelmore, et al., 1991; Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 88: 9828-9832) En BSA,

se extraen dos muestras de ADN a granel de una población segregante que se origina a partir de un solo cruce. Estas muestras a granel 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 en el presente documento un procedimiento para producir una planta de pepino resistente al DM que comprende: (a) cruzar una línea de pepino que tiene resistencia al DM con una segunda línea de pepino que carece de resistencia al DM para formar una población segregante; (b) detectar la población en busca de resistencia al DM; y (c) seleccionar uno o más miembros de la población con dicha resistencia al DM. La línea de pepino que tiene resistencia al DM puede cruzarse con la segunda línea de pepino durante al menos dos generaciones (por ejemplo, creando una población F_2 o BC_1S_1). En particular, la línea de pepino que tiene resistencia al DM puede ser PI197088, o una progenie de la misma. Las plantas pueden identificarse como resistentes al DM antes del cruce. Las plantas pueden seleccionarse en función de la resistencia parcial o completa al DM. La población segregante puede autocruzarse y la población subsiguiente puede someterse a detección de 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) detectar dicha población en busca de resistencia al DM; y (c) seleccionar al menos un miembro de dicha población que exhibe resistencia al DM. La línea de pepino con resistencia al DM puede cruzarse con la segunda línea de pepino durante al menos dos generaciones (por ejemplo, creando una población F_2 o BC_1S_1), o hasta 2-10 generaciones. Las plantas pueden identificarse como resistentes al DM antes del cruce. La población segregante puede autocruzarse y la población subsiguiente puede someterse a detección de resistencia.

Las plantas de pepino (y sus partes, incluidas las semillas, el polen y los óvulos) generadas usando un procedimiento como se divulga en el presente documento también se divulgan, y pueden formar parte o generarse a partir de un programa de reproducción. La elección del procedimiento de reproducción depende del modo de reproducción de la planta, la heredabilidad del rasgo o rasgos que se mejoran y el tipo de variedad de cultivo utilizada comercialmente (por ejemplo, variedad de cultivo híbrida F_1 , variedad de cultivo de línea pura, etc.). Enfoques seleccionados para la reproducción de las plantas se exponen a continuación. Se puede mejorar un programa de reproducción utilizando la selección asistida por marcadores de la progenie de cualquier cruce. Se entiende además que cualquier variedad de cultivo comercial y no comercial puede utilizarse en un programa de reproducción. Factores como, por ejemplo, el vigor de la germinación, 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 generalmente determinarán la elección.

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 puede llevar a cabo un programa de retrocruzamiento o reproducción recurrente.

La complejidad de la herencia influye en la elección del procedimiento de reproducción. El mejoramiento de retrocruzamiento puede usarse para transferir uno o unos pocos genes favorables para un rasgo altamente heredable a una variedad de cultivo deseable. Este enfoque se ha utilizado ampliamente para reproducción de variedades de cultivo 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 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 nuevas variedades de cultivo comerciales; los que aún tienen deficiencias en los rasgos pueden ser utilizados como progenitores para híbridos, o para producir nuevas poblaciones para una mayor selección.

Un procedimiento para identificar una planta superior es observar su rendimiento en relación con otras plantas experimentales y con una variedad de cultivo estándar ampliamente cultivado. Si una sola observación no es concluyente, las observaciones replicadas pueden proporcionar una mejor estimación de su valor genético. Un criador puede seleccionar y cruzar dos o más líneas parentales, seguido por una autopolinización o polinización entre hermanos repetida y selección, 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 seleccionados con fertilidad masculina 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 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 criador de continuar con el cruce híbrido específico.

Los procedimientos de mejora genética de pedigrí y selección recurrente pueden usarse para desarrollar variedades de cultivo a partir de poblaciones reproductoras. Los programas de reproducción combinan los rasgos deseables de dos o más variedades de cultivo o varias fuentes de base amplia en conjuntos de reproducción a partir de los cuales se desarrollan variedades de cultivo mediante la autopolinización y la selección de los fenotipos deseados en líneas parentales. Estas líneas se utilizan para producir nuevas variedades de cultivo. Se pueden evaluar nuevas variedades de cultivo para determinar cuáles tienen potencial comercial.

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 una F_1 . Una población F_2 es producida por autopolinización de una o varias 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 nuevas variedades de cultivo.

La reproducción por retrocruzamiento y la reproducción cruzada se han usado para transferir genes para un rasgo simplemente heredado y altamente heredable en una variedad de cultivo homocigoto deseable o línea endogámica, que es el progenitor recurrente. La fuente del rasgo a transferir se llama progenitor donante. Se espera que la planta resultante obtenida de un exitoso programa de retrocruzamiento tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, variedad de cultivo) 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 retrocruzamiento con selección, se espera que la línea resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, variedad de cultivo) y el rasgo deseable transferido del progenitor donante.

La reproducción cruzada o retrocruzada de una planta de pepino resistente a DM puede realizarse en la que el otro progenitor (segunda planta de pepino) es resistente al DM o el otro progenitor no es resistente al DM.

Las plantas de pepino 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 autopolinizar y crear la próxima generación. Cuando la población ha avanzado desde la F_2 hasta el nivel deseado de endogamia, las plantas de las que se derivan las líneas se rastrearán a diferentes individuos F_2 . 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 F_2 muestreadas originalmente en la población estarán representadas por una prole cuando se complete el avance de la generación.

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

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 PI197088, 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 prole resistente al DM, como se describe en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2009-0265083. La fuente del rasgo de resistencia al DM para usar en un programa de reproducción no puede derivarse de una planta seleccionada del grupo que consiste en PI197088, 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 prole resistente al DM.

También se divulga en el presente documento 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 en el presente documento 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 unidos a dicho locus genético que confiere resistencia al DM, y en el que dicha planta de pepino no es el Acceso PI197088.

Se pueden identificar fuentes adicionales de resistencia al DM para usar en un programa de reproducción seleccionando el germoplasma de pepino para determinar la resistencia al DM. Además, las plantas de pepino pueden seleccionarse para determinar la resistencia al DM identificando el 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 también pueden seleccionarse para determinar la resistencia al DM usando una prueba tal como una detección de campo o de invernadero y esquemas de clasificación de enfermedades como se describe en el Ejemplo 1, el Ejemplo 2 o el Ejemplo 8.

Se pueden identificar fuentes adicionales de resistencia al DM para su uso en un programa de reproducción mediante la detección con uno o más marcadores moleculares unidos a un locus genético que confiere resistencia al DM, tal como los identificados en el presente documento.

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

Las líneas de pepino que tienen resistencia al DM pueden usarse en programas de reproducción para combinar resistencia al DM con rasgos adicionales de interés. La 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 reproducción pueden usarse para combinar el rasgo de resistencia al DM con alelos que contribuyen al tamaño y la forma de la fruta de pepino. Los programas de reproducción también se pueden usar para combinar la resistencia al DM con uno o más rasgos resistentes a la enfermedad. Dichos rasgos resistentes a la enfermedad incluyen resistencia a: Marchitamiento por *Verticillium*, nematodos del nudo de la raíz, Virus del Mosaico del Tabaco, Costra del Pepino, Moho Pulvurulento, Corinesporiosis, Virus del Mosaico del Pepino y Marchitamiento por *Fusarium*. Además, los rasgos que se combinan pueden ser heredados conjuntamente en cruces posteriores.

También se divulgan en el presente documento partes de las plantas de pepino resistentes al DM producidas por un procedimiento descrito en el presente 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, peciolo u hojas, vástagos y rizomas. Las partes de las plantas también incluyen las partes de una fruta de pepino, que incluyen la placenta, la columela y el pericarpio. La parte de la planta puede ser una semilla.

También se divulgan en el presente documento 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. En particular, partes de plantas de pepino pueden derivarse de una planta de pepino seleccionada del grupo que consiste en las líneas de pepino depositadas descritas en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2009-0265083, y su progenie resistente al DM. 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_DM se exponen en las Tablas 1-8 a continuación.

Tabla 1: Características fisiológicas y morfológicas de la línea ASL147-2027 Mo

	CARACTERÍSTICA	ASL147-2027
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Rebanadas
	Cultivo predominante	Exterior
	Área de mejor adaptación en los EE. U.U.	Mayoría de las áreas
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	50-55
3.	Planta	
	Condición habitual	Vid
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Monoico
	Color de la flor	Amarillo
4.	Fruta en etapa de madurez comestible	
	Forma del cuello de la fruta	Sin cuello
	Ahusamiento de la fruta	Extremos romos o redondeados
	Espesor de la piel	Gruesa
	Nervaduras de la piel	Con nervaduras
	Dureza de la piel	Dura
	Brillo de la piel	Mate

	Color de la espina	Blanco
	Calidad de la espina	Gruesa
	Densidad de la espina	Poca
	Sabor	Sin amargo
5.	Resistencia a Insectos	
	Áfidos (<i>Aphis gossypii</i>)	Susceptible

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

	CARACTERÍSTICA	EUR 154-1012 GY
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Fesco
	Cultivo predominante	Invernadero
	Área de mejor adaptación en EE. UU.	España

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	EUR 154-1012 GY
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65
3.	Planta	
	Condición habitual	Vid
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Sólo flores femeninas
	Color de la Flor	Amarillo
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Longitud entrenudos	5-8 cm
	Forma del tallo	Acanalada-puntiaguda
5.	Fruta en etapa de madurez comestible	
	Longitud	30-32 cm
	Diámetro medio	45-50 mm
	Peso	300-400 g
	Color de la piel	Verde medio
	Bandas amarillentas del extremo de la flor	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	Media
	Ahusamiento de la fruta	Redondeada
	Sección transversal del extremo del tallo	rd
	Sección transversal media	rd
	Sección transversal del extremo de la flor	rd
	Espesor de la piel	Delgada
	Nervaduras de la piel	Con nervaduras
	Dureza de la piel	baja
	Brillo de la piel	Brillante
	Color de la espina	Blanco
	Calidad de la espina	Fina
	Densidad de la espina	Muy baja
	Tubérculos (verrugas)	No
	Sabor	Sin amargo
6.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	35-37 cm
	Diámetro medio	50-60 mm
	Color	Amarillo
	Patrón de color	Rayado
	Superficie	Lisa
	Enmallado	Ligero o ninguno
	Conjunto de la fruta	Normalmente sin semillas
7.	Semillas	
	No. por fruta	30-80
	Por 1.000 semillas	30-35 g
8.	Resistencia a enfermedades	
	Costra de pepino (Gumosis) (<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	
	Moho Velloso	Resistente
	Moho Pulvurulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Resistente

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	EUR 154-1012 GY
	Virus del Mosaico del Pepino	Susceptible
	Virus de amarillamiento de la vena del pepino	Susceptible
	Virus del trastorno del retraso del crecimiento del pepino amarillo	Resistencia intermedia
9.	Resistencia a insectos	
	Áfidos (<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 EE. UU.	España
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65
3.	Planta	
	Condición habitual	Vid
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Sólo flores femeninas
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Longitud entrenudos	50-80 mm
	Forma del tallo	Acanalado-puntiagudo
5.	Fruta en etapa de madurez comestible	
	Longitud	30-32 cm
	Diámetro medio	45-50 mm
	Peso	300-400 g
	Color de la piel	Verde medio
	Bandas amarillentas del extremo de la flor	No
	Color predominante en el extremo del tallo	Verde uniforme
	Color predominante en el extremo de flor	Verde uniforme
	Forma del cuello de la fruta	Sin cuello
	Ahusamiento de la fruta	Redondeado
	Sección transversal del extremo del tallo	rd
	Sección transversal media	rd
	Sección transversal del extremo de la flor	rd
	Espesor de la piel	Delgado
	Nervaduras de la piel	Con nervaduras
	Dureza de la piel baja	Baja
	Brillo de la piel	Brillante
	Color de la espina	Blanca
	Calidad de la espina	Fina
	Densidad de la espina	Baja
Tubérculos (verruugas)	No	
Sabor	Sin amargo	
6.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	35-37 cm
	Diámetro medio	50-60 mm
	Color	Amarillo
	Patrón de color	Rayado
	Superficie	Lisa
	Enmallado	Ligero
	Conjunto de la fruta	Normalmente sin semillas
7.	Semillas	
	No. por fruta	30-80
	Por 1.000 semillas	30-35 g
8.	Resistencia a enfermedades	
	Moho veloso	Resistente
	Moho pulverulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Resistente
	Virus del Mosaico del Pepino	Susceptible

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	EUR 154-1012 GY
	Virus de amarillamiento de la vena del pepino	Susceptible
	Virus del trastorno del retraso del crecimiento del pepino amarillo	Resistencia intermedia
9.	Resistencia a insectos	
	Áfidos (<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	Encurtidos
	Cultivo predominante	Exterior
	Área de mejor adaptación en los EE. UU.	Mayoría de las áreas
2	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-62
3	Planta	
	Condición habitual	Vid
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	100% Sólo flores femeninas
4	Color de la flor	Amarillo
	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Número de nodos desde las hojas del cotiledón hasta el nodo que porta la primera flor del pistilo	3-4
5	Longitud entrenudos	20-30
	Forma del tallo	Acanalado-puntiagudo
	Hoja	Lámina madura de la tercera hoja
	Longitud	200-250 mm
6	Ancho	150-200 mm
	Longitud del pecíolo	6,5 – 8
	Fruta en etapa de madurez comestible	
	Longitud	12-14 cm
7	Diámetro medio	35-45
	Peso	80-120 g
	Color de la piel	Jaspeado o moteado de amarillo
	Bandas amarillentas del extremo de la flor	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
	Ahusamiento de la fruta	Extremos romos o redondeados
	Sección transversal del extremo del tallo	Cuadrada
	Sección transversal media	Cuadrada
	Sección transversal del extremo de la flor	Cuadrada
	Espesor de la piel	Delgada
	Nervaduras de la piel	Con nervaduras
	Dureza de la piel	Blanda
	Brillo de la piel	Mate
	Color de la espina	Blanco
	Calidad de la espina	Fina
Densidad de la espina	Mucha	
Tubérculos (verrugas)	Pocos, prominentes (Ensalada)	
Sabor	Sin amargo	
8	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	25 – 30 cm
	Diámetro medio	10 – 13
	Color	Crema
	Patrón del color	Sin rayas
	Superficie	Lisa
	Enmallado	Ligero o ninguno
Conjunto de la fruta	Partenocárpicamente	
9	Semillas	
	No. por fruta	150-200
9	Por 1.000 semillas	22-25 g
	Resistencia a enfermedades	

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	GSP 33-1094 GY
	Costra de pepino (<i>Gumosis</i>) (<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	Susceptible
	Moho veloso	Resistente
	Moho Pulvurulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Resistente
	Corinesporosis (<i>Corynespora cassiicola</i>)	Susceptible
	Virus del Mosaico del Pepino	Resistente
10	Resistencia a los insectos	
	Áfidos (<i>Aphis gossypii</i>)	Susceptible

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

	CARACTERÍSTICAS	GPN 33-1093 GY
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Encurtidos
	Cultivo predominante	Exterior
	Área de mejor adaptación en los EE. UU.	La mayoría de áreas
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65
3.	Planta	
	Condición habitual	Vid
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Principalmente sólo flores femeninas
	Color de la Flor	Amarillo
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Número de nodos desde las hojas de cotiledón hasta el nodo que porta la primera flor del pistilo	2-3
	Longitud entrenudos	20-25
	Forma del tallo	Acanalada-puntiaguda
5.	Hoja	Lámina madura de la tercera hoja
	Longitud	200-230 mm
	Ancho	150-200 mm
	Longitud del peciolo	4-8
6.	Fruta en etapa de madurez comestible	
	Longitud	11-13 cm
	Diámetro medio	35-45
	Peso	80-120 g
	Color de la piel	Jaspeado o moteado con amarillo
	Bandas amarillentas del extremo de la flor	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 Arlington)
	Forma del cuello de la fruta	Sin cuello
	Ahusamiento de la fruta	Extremos romos o redondeados
	Sección transversal del extremo del tallo	Cuadrada
	Sección transversal media	Cuadrada
	Sección transversal del extremo de la flor	Cuadrada
	Espesor de la piel	Gruesa
	Nervaduras de la piel	Con nervaduras
	Dureza de la piel	Blanda
	Brillo de la piel	Mate
	Color de la espina	Blanco
	Calidad de la espina	Fina
	Densidad de la espina	Poca
	Tubérculos (verruugas)	Pocos, Prominentes (Ensalada)
	Sabor	Sin amargo
7.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	25-30 cm
	Diámetro medio	10-13
	Color	Crema
	Patrón de color	Rayado

(continuación)

	CARACTERÍSTICAS	GPN 33-1093 GY
	Superficie	Lisa
	Enmallado	Ligero o ninguno
	Conjunto de la fruta	Normalmente sin semillas
8.	Semillas	
	No. por fruta	150-200
	Por 1.000 semillas	22-25 g
9.	Resistencia a enfermedades	
	Costra de pepino (Gumosis) (<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	Susceptible
	Moho Velloso	Resistente
	Moho pulverulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Resistente
	Corinesporiosis (<i>Corynespora cassicola</i>)	Susceptible
	Virus del Mosaico del Pepino	Resistente
10.	Resistencia a insectos	
	Áfidos (<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	Fesco
	Cultivo predominante	Exterior
	Área de mejor adaptación en EE. UU.	Turquía y Medio Este
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65
3.	Planta	
	Condición habitual	Vid
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Monoico
	Color de la flor	Amarillo
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Longitud entrenudos	30-50 mm
	Forma del tallo	Acanalada-puntiaguda
5.	Fruta en etapa de madurez comestible	
	Longitud	12-15 cm
	Diámetro medio	35-45
	Peso	80-120 g
	Color de la piel	Verde
	Bandas amarillentas del extremo de la flor	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
	Ahusamiento de la fruta	Extremos romos o redondeados
	Sección transversal del extremo del tallo	rd
	Sección transversal media	rd
	Sección transversal del extremo de la flor	rd
	Espesor de la piel	Delgada
	Nervaduras de la piel	Sin nervaduras
	Dureza de la piel	Baja
	Brillo de la piel	Brillante
	Color de la espina	Blanco
	Calidad de la espina	Fina
	Densidad de la espina	Alta
	Tubérculos (verruugas)	No
	Sabor	Sin amargo
6.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	18-20 cm
	Diámetro medio	30-45 mm
	Color	Crema

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	03/8020-20_TUP03_DMFL_1
	Patrón de color	Rayado
	Superficie	Lisa
	Enmallado	Ligero o ninguno
	Conjunto de la fruta	Normalmente con semillas
7.	Semillas	
	No. por fruta	150-200
	Por 1.000 semillas	22-25 g
8.	Resistencia a enfermedades	
	Costra de pepino (Gumosis) (<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	Resistente
	Moho Velloso (<i>Pseudoperonospora cubensis</i>)	Resistente
	Moho Pulvurulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Susceptible
	Virus del Mosaico del Pepino	Susceptible
9.	Resistencia a insectos	
	Áfidos (<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
1.	Tipo	Pepino
	Uso predominante	Fesco
	Cultivo predominante	Exterior
	Área de mejor adaptación en los EE. UU.	Turquía y Medio Este
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65
3.	Planta	
	Condición habitual	Vid
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Monoico
	Color de la flor	Amarillo
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Longitud entrenudos	30-50 mm
	Forma del tallo	Acanalada-puntiaguda
5.	Fruta en etapa de madurez comestible	
	Longitud	15-17 cm
	Diámetro medio	35-45
	Peso	80-120 g
	Color de la piel	Verde
	Bandas amarillentas del extremo de la flor	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
	Ahusamiento de la fruta	Extremos romos o redondeados
	Sección transversal del extremo del tallo	rd
	Sección transversal media	rd
	Sección transversal del extremo de la flor	rd
	Espesor de la piel	Delgada
	Nervaduras de la piel	Sin nervaduras
	Dureza de la piel	Baja
	Brillo de la piel	Brillante
	Color de la espina	Blanco
	Calidad de la espina	Fina
	Densidad de la espina	Baja
	Tubérculos (verrugas)	No
6.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	12-23 cm
	Diámetro medio	30-45 mm
	Color	Crema
	Patrón de color	Rayado
	Superficie	Lisa
	Enmallado	Ligero o ninguno

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	03/8024-19_TUP03_DMFL_1
	Conjunto de la fruta	Normalmente con semillas
7.	Semillas	
	No. por fruta	150-200
	Por 1.000 semillas	22-25 g
8.	Resistencia a enfermedades	
	Costra de pepino (Gumosis) (<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	Susceptible
	Moho Velloso	Resistente
	Moho Pulvurulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Resistencia intermedia
	Virus del Mosaico del Pepino	Resistente
9.	Resistencia a insectos	
	Áfidos (<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	Fesco
	Cultivo predominante	Exterior
	Área de mejor adaptación en los EE. UU.	Turquía y Medio Este
2.	Madurez	
	Días desde la siembra hasta el mercado	60-65
3.	Planta	
	Condición habitual	Vid
	Crecimiento	Indeterminado
	Sexo	Monoico
	Color de la Flor	Amarillo
4.	Tallo	
	Longitud	150-200 cm
	Longitud entrenudos	30-50 mm
	Forma del tallo	Acanalada-puntiaguda
5.	Fruta en etapa de madurez comestible	
	Longitud	16-18 cm
	Diámetro medio	35-45
	Peso	80-120 g
	Color de la piel	Verde
	Bandas amarillentas del extremo de la flor	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
	Ahusamiento de la fruta	Extremos romos o redondeados
	Sección transversal del extremo del tallo	rd
	Sección transversal media	rd
	Sección transversal del extremo de la flor	rd
	Espesor de la piel	Delgada
	Nervaduras de la piel	Sin nervaduras
	Dureza de la piel	Baja
	Brillo de la piel	Brillante
	Color de la espina	Blanco
	Calidad de la espina	Fina
	Densidad de la espina	Media
	Tubérculos (verrujas)	No
	Sabor	Sin amargo
6.	Fruta en la madurez de la cosecha	
	Longitud	20-24 cm
	Diámetro medio	30-45 mm
	Color	Crema
	Patrón de color	Rayado
	Superficie	Lisa
	Enmallado	Ligero o ninguno
	Conjunto de la fruta	Normalmente con semillas
7.	Semillas	

(continuación)

	CARACTERÍSTICA	03/8039-5_TUP03_DMFL_1
	No. por fruta	150-200
	Por 1.000 semillas	22-25 g
8.	Resistencia a enfermedades	
	Costra de pepino (Gumosis) (<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	Resistente
	Moho Velloso	Resistente
	Moho Pulvurulento (<i>Erysiphe cichoracearum</i>)	Resistencia intermedia
	Virus del Mosaico del Pepino	Susceptible
9.	Resistencia a insectos	
	Áfidos (<i>Aphis gossypii</i>)	Susceptible

Se divulga en el presente documento 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 el que dicha planta demuestra resistencia a uno o más de la Marchitamiento por Verticillium, nematodos de nudos de raíz, Virus del Mosaico del Tabaco, Costra del Pepino, Moho Pulvurulento, Corinesporiosis, Virus del Mosaico del Pepino, Virus de la Mancha Anular de la Papaya, Virus del Mosaico Amarillo del Calabacín y Marchitamiento por Fusarium. Esas plantas de pepino, o la fruta o semillas de las mismas, pueden seleccionarse de la progenie resistente al DM de las líneas descritas en las Tablas 1-8. Tal planta de pepino resistente al DM también puede demostrar resistencia a uno o más de: Marchitamiento por Verticillium, Costra del Pepino, Moho Pulvurulento, Corinesporiosis, Virus del Mosaico del Pepino, nematodos, Virus del Mosaico del Tabaco, Virus de la Mancha Anular de la Papaya, Virus del Mosaico Amarillo del Calabacín y Marchitamiento por Fusarium y puede mostrar una reducción mayor del 10%, o una reducción mayor del 30%, o una reducción mayor del 60% en los síntomas foliares de 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 en el presente documento una planta de pepino resistente al 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: tamaño, forma, color, apariencia superficial de la fruta; número de semillas, tamaño de la semilla, número de lóculos; espesor y dureza 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 en el campo, adaptación al crecimiento en invernadero, y resistencia a una o más enfermedades o enfermedades que causan organismos tales como Marchitamiento por Verticillium, nematodos del nudo de raíz, Virus del Mosaico del Tabaco, Costra de Pepino, Moho Pulvurulento, Moho Velloso, Corinesporiosis, Virus del Mosaico del Pepino y Marchitamiento por Fusarium. Además, el "rasgo deseable" o los "rasgos deseables" pueden seleccionarse del grupo que consiste en: tamaño de la fruta, forma de la fruta, color de la fruta, sabor de la fruta, el número de semillas por fruta, el tamaño de las semillas, el espesor del tejido del pericarpio de la fruta, la vida útil de la fruta, resistencia al Marchitamiento por Verticillium, resistencia a la Costra del Pepino, resistencia al Moho Pulvurulento, resistencia a la Corinesporiosis, resistencia al Virus del Mosaico del Pepino, resistencia a los nematodos, resistencia al Virus del Mosaico del Tabaco, resistencia al Virus de la Mancha Anular de la Papaya, resistencia al Virus del Mosaico Amarillo del Calabacín y resistencia al Marchitamiento por Fusarium. Aún más, el "rasgo deseable" o los "rasgos deseables" pueden seleccionarse del grupo que consiste en: tamaño de la fruta, forma de la fruta, color de la fruta, sabor de la fruta, la vida útil de la fruta, resistencia a la Costra del Pepino, resistencia al Moho Pulvurulento, resistencia a la Corinesporiosis y resistencia al Virus del Mosaico del Pepino. Finalmente, el "rasgo deseable" o los "rasgos deseables" pueden seleccionarse del grupo que consiste en: tamaño de la fruta, forma de la fruta, color de la fruta, calidad de la 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 lesiones cloróticas y/o necróticas en relación con una planta de control no resistente tras la inoculación o infección con DM. También se divulga en el presente documento un procedimiento para producir una planta de pepino resistente al DM que comprende: cruzar una línea de pepino que tiene resistencia al DM con una segunda planta que carece de resistencia al DM pero capaz de donar uno o más de los rasgos deseables mencionados anteriormente. Los ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones tienen fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo de Moho Velloso y detección de enfermedades - campo

Pseudoperonospora cubensis (Berk. y Curt.) Rostow es un patógeno obligado. Por lo tanto, debe mantenerse en plantas vivas de una cucurbitácea susceptible. Se utilizaron dos aislamientos en la detección de resistencia en este

estudio. El aislado "viejo" de *P. cubensis* se caracteriza por su patogenicidad tanto en la calabaza como en el pepino. El aislado "nuevo" 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 al campo, se plantaron huéspedes de pepino susceptibles 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 desarrollaron las lesiones cloróticas, las plantas se colocaron en la cámara de rocío durante la noche para inducir la esporulación. Este cultivo se transfirió semanalmente al pepino hasta que las plantas se trasplantaron al campo.

Los ensayos se sembraron directamente en el campo. Se sembraron filas esparcidoras de pepino susceptible en cada tercera fila. Cuando las filas esparcidoras tenían dos o tres semanas de edad, las plantas infectadas (criadas en la sala de crecimiento) se trasplantaron dentro de las filas 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 de los Estados Unidos.

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

Las pruebas se evaluaron una vez que los síntomas se habían desarrollado en el control susceptible, a veces llamado control susceptible. Se utilizaron controles que incluyen PI197088 (control resistente); DMP21, GP14, LLP1, POINSETT 76, (controles resistente intermedio); y SPRINT440, MARAM y SMR58 (controles susceptibles). 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 intervalos del índice de enfermedad para las categorías "Resistente", "Resistente Intermedio" 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 de bloques completos al azar 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 3,7 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 Moho Velloso y detección de enfermedades - invernadero

Pseudoperonospora cubensis (Berk. et Curt.) Rostow, como se describió y almacenó anteriormente en el Ejemplo 1, también se usó para detecciones en invernadero. Dos semanas antes de la inoculación de detección, se sembraron huéspedes de pepino susceptibles en bandejas de 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 aproximadamente 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.

Las cribados de cotiledones se plantaron en bandejas de plántulas. Se plantaron controles susceptibles y resistentes en ambos lados de cada bandeja. Las plantas se sembraron y se mantuvieron en un invernadero a 26 °C (80 °F). La inoculación se realizó a los 7 a 10 días para los cotiledones y en la etapa de la quinta hoja para las hojas verdaderas. Las plantas se inocularon mediante nebulización con suspensión esporangial utilizando una botella atomizadora 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.

Las pruebas se evaluaron una vez que se desarrollaron los síntomas en el control susceptible, a veces denominado control susceptible. Los controles utilizados fueron PI197088 (control resistente), MARAM (control susceptible) y SMR58 (control resistente). Los supervivientes resistentes e intermedios de los cribados de cotiledones 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 los cribados de hojas verdaderas se trasplantaron directamente en bolsas de cultivo de invernadero.

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

Se encontró que la resistencia al Moho Velloso identificada en la línea de introducción de plantas PI197088 era estable en múltiples ubicaciones del cribado en todo el mundo y contra aislamientos tanto antiguos (patógenos en la calabaza y pepino) como recientemente emergidos (no considerados patógenos en la calabaza y muy patógenos en el pepino) de *P. cubensis*. Sin embargo, tanto las plantas como las frutas de PI197088 son comercialmente inaceptables. Un locus que contribuye a la resistencia al Moho Velloso 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 aisló de líneas resistentes para detectar polimorfismos marcadores entre el donante y los progenitores recurrentes.

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

Se realizaron cruces iniciales entre PI197088 y un progenitor susceptible recurrente (variedad de cultivo Lucinde) 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 detectar la resistencia al DM en una colección de líneas de élite que muestran tipos de plantas y frutas horticólmamente aceptables, y deberían tener introgresada la resistencia al DM de PI197088. Estas pruebas se realizaron en tres ubicaciones (Woodland, CA, Tifton, GA y Wageningen, NL) y se utilizaron dos aislamientos de *Pseudoperonospora cubensis*: un aislado "más viejo", patógeno en la calabaza y el pepino, y el putativo aislado "nuevo", no considerado patógeno en la calabaza pero muy virulento en el pepino. Simultáneamente, estas muestras se genotiparon con marcadores moleculares para identificar un QTL que contribuye a la resistencia al DM en PI197088 (véase también el Ejemplo 4). Estas pruebas asocian la respuesta a la patología del DM con la presencia de un alelo de PI197088. Durante este tiempo, los reproductores que enviaron 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 determinar la resistencia al Moho Velloso.

Tabla 9: Pedigrí para líneas de pepino enumeradas en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos 2009-0265083 para la cual se realizó un depósito de semillas

Línea de Pepino	Pedigrí
ASL147-2027	PI-197088-MO/ASL-1105-GY:@.1.1.1.1.4.
EUR154-1012GY	[(ALCOR(WMV)xVENTURAxPIDM/NIZ335* <input type="checkbox"/> 2)]X[(ALCOR(V)xVENTURAxPIDM/CARMEN* <input type="checkbox"/> 2)]X[(ALCOR(V)xVENTURAxPIDM/CARMEN* <input type="checkbox"/> 2)]X[(ALCOR(V)xVENTURAxPIDM/CARMEN* <input type="checkbox"/> 2)]
EUR154-1021GY	(ALCOR(WMV)xVENTURAxPIDM/NIZ335* <input type="checkbox"/> 2)X(ALCOR(V)xVENTURAxPIDM/CARMEN* <input type="checkbox"/> 2)
GSP33-1094GY	F9-(Jazz/5/Sal//SMR-58Nim/PiHoNi/3/NO-50/4/H-171wit/SMR-58Nim//Carol/3/NO-50 * <input type="checkbox"/> 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_DMFL_1	BA.KO {(147W*PI)*225} * <input type="checkbox"/> (BA MO*part) BC4 03/8020-20_TUP03_DMFL_1+---1_TUNE03_DM-2_TUp05 TKFA06
03/8024-19_TUP03_DMFL_1	BA.KO {(147W*PI)*225} * <input type="checkbox"/> [(me/n*147wmv)bc4f5*(bamo*parth)bc4f5] 03/8024-19_TUP03_DMFL_1+---4_TUNE03_DM-1_TUp05 TKFA06
03/8039-5_TUP03_DMFL_1	BA.KO {(147W*PI)*225} * <input type="checkbox"/> HP 159] * <input type="checkbox"/> [(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 del Moho Velloso (DM) asociadas para cinco marcadores en la región del QTL de resistencia al DM. Los datos representan treinta y siete líneas de pepino

Marcador	Posición cM ¹	Hap ² . 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

(continuación)

Marcador	Posición cM ¹	Hap ² . 1	Hap. 2	Hap. 3	Hap. 4	Hap. 5
Marcadores y haplotipos de muestra						
CAPs_17179	11	SUS	SUS	SUS	SUS	RES
CAPs_17563/66	39	SUS	RES	SUS	RES	RES
Resumen de estadísticas del Moho Velloso asociadas con los haplotipos 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
¹ cM = cM = centiMorgans, ² Hap = Haplotipo con cinco marcadores en el QTL del DM. ³ SUS = Alelo susceptible al Moho Velloso asociado con el progenitor Lucinde en el mapeo poblacional. ⁴ RES = Alelo de resistencia al Moho Velloso asociado con el progenitor PI197088 en el mapeo poblacional. ⁵ DM = Puntuaciones fenotípicas en una prueba de patología para Moho Velloso.						

5 Se analizaron treinta y siete líneas de pepino para detectar reacciones a *Pseudoperonospora cubensis* en un cribado de patología controlada. Dieciocho plantas fueron probadas en tres réplicas de seis plantas. De cada réplica, tres plantas (total de tres réplicas = 9) se genotiparon para cinco marcadores que definen la región del QTL del DM. A partir de estos datos, se desarrollaron genotipos de marcadores de consenso y resumen de estadísticas del 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 con el QTL del DM. Los cinco marcadores se seleccionaron en función de un rendimiento confiable en el laboratorio y/o asociaciones con el fenotipo del DM que fueron más consistentes que los otros marcadores.

15 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 por el alelo RES en los marcadores CAPs_ENK60, CAPs_ENK59, CAPs_17563/66 produce un cambio en el fenotipo medio del DM de 4,8 a 2,2 en pruebas en las que la escala de calificación es 1 = resistente y 5 = susceptible.

20 Ejemplo 4: Análisis de marcadores de plantas de pepino resistentes al DM

25 Las plantas resistentes se analizan usando marcadores genéticos distribuidos por todo el genoma del pepino. Los marcadores genéticos para *Cucumis* están disponibles a través de una variedad de fuentes, tales como USDA-ARS (Unidad de Investigación de Cultivos Vegetales, del Departamento de Horticultura, Universidad de Wisconsin-Madison). Se detectaron previamente un conjunto más grande de marcadores en las líneas parentales y se seleccionaron marcadores polimórficos, de entre los marcadores detectados previamente, para una detección 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 introgresado de la línea de donantes resistentes, PI19788, 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 al DM. En este análisis, los marcadores CAPs_ENK60, CAPs_17170 y CAPs_17563/66 se mantuvieron significativos, generando un modelo con un R² de 0,47.

35 Los pares de cebadores y las condiciones de reacción utilizadas para identificar alelos en marcadores dados en el cromosoma 5, para definir el QTL para resistencia al DM en *Cucumis* sp., se muestran en la Tabla 11 y la Tabla 12. Para el marcador 17179, se usó el mismo cebador inverso para los dos alelos.

Tabla 11. Pares de cebadores utilizados (SEQ ID NOs: 1 a 19) para identificar alelos del QTL en el cromosoma 5

Nombre del marcador	Cebador directo (5' a 3')	Cebador inverso (5' a 3')	Enzima	Condición de la electroforesis	Notas
CAPs_21826	TCAAGCCATAGTC TAACCCATGC	CGCTATATCATGGATG GCTAGAAAAT	NsiI	Gel de agarosa al 3%	
CAPs_ENK60	GAATAGATAGGCT ACACTTTTCCCTCT TG	GTATAAAAACCTTGAGTG AATTTAATGCAATGAA	HpyCH4 IV	Gel de agarosa al 3%	
CAPs_ENK59	TGTTTCATAAECTAC AGCTTCATGTAA ATATTACT	TAGTTTCTTTCTTGCT GGACGAACC		Gel de agarosa al 3%	
CAPs_17170	TATGGGCTATGTG AAACTCTT	AGCGTGACAACACTACA AAACAT	Afl III	Gel de agarosa al 3%	
CAPs_17179	GAAATAAATGGAT GAAGCGAGGA	GTTCGTTGATCAGTGT GATATTTCAAT		Capilar	Cebador directo para el alelo PI197088
CAPs_17179	ATCGGTCTTTGCCA CCTTTTG	GTTCGTTGATCAGTGT GATATTTCAAT		Capilar	Cebador directo para el alelo Lucinde
CAPs_18229	TGTTTGGAAGGGT TTCTTGGG	TGCCATGTCGCCAACA GT	HindIII	Gel de agarosa al 3%	
CAPs_17563/66	AGGAGGGACAGAG AGAAATTTGATATA AT	TCCGTTTTAGGTGATT GTCAAAATACAT		Capilar	
CAPs_ENK70	AAAGTTGATAGTG CATGAGTTGGTAA AATA	TCCGCTTATGGGTTTT TGTGAG	TaqI	Gel de agarosa al 3%	
UBC12-1200	TATGGGCTATGTG AAACTCTT	AGCGTGACAACACTACA AAACAT			

Tabla 12: Condiciones de reacción para PCR

PCR para: Marcadores que corren en gel de agarosa (CAPs_ENK60, CAPs_ENK59, CAPs_17170, CAPs_18229, CAPs_21826, CAPs_ENK70)		
Componente	Combinar para 10 µl de reacción	Mezcla maestra para 10:
Mezcla maestra de Taq HotStart-IT (2X)	5	50
Cebador directo 5 µM	0,53	5,3
Cebador inverso 5 µM	0,53	5,3
H ₂ O MQ	3.14	31,4
ADN plantilla	0,8	8
Suma	10	100
PCR para: CAPs_17179		
Componente	Combinar para 10 µl de reacción	Mezcla maestra para 10:
Mezcla maestra de Taq HotStart-IT (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 marcado 1475	0,53	5,3
H ₂ O MQ	2,557	25,57
ADN plantilla	0,8	8
Suma	10	100
PCR para: CAPs_17563/66		
Componente	Combinar para 10 µl de reacción	Mezcla maestra para 10:
Mezcla maestra de Taq HotStart-IT (2X)	5	50
Cebador 5 µM	0,53	5,3
Cebador con cola 5 µM	0,053	0,53
Cebador marcado 1475	0,53	5,3
H ₂ O MQ	3,087	30,87
ADN plantilla	0,8	8
Suma	10	100

5 El análisis de los marcadores genéticos de la Tabla 11 se realizó por 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 de PCR ABI: parte No. N808-0006), 1,0 µl de mezcla de dNTP 10x (la 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).

15 La secuenciación del ADN genómico que flanquea los loci inicialmente detectados en la región del QTL podría explicar parte de la variabilidad que se observó en algunas puntuaciones de resistencia al DM. Por ejemplo, en ciertas líneas con haplotipos resistentes, pero con puntuaciones de resistencia variable, la variabilidad podría observarse cerca del marcador CAPs_17170. Por lo tanto, cuando las secuencias de alelos en este locus se compararon entre dos líneas dadas con diferentes puntuaciones 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. 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 del marcador particular.

25 Se obtuvieron secuencias de ADN genómico y se utilizaron para diseñar cebadores de PCR para detectar polimorfismos de un solo nucleótido, como marcadores para identificar la presencia de los QTL. Las secuencias genómicas que flanquean 50 sitios de SNP unidos a los QTL 1, 2 o 4 en los cromosomas 5, 4 y 2, respectivamente, se presentan en la Tabla 13 (SEQ ID NOs: 20-69). Estas secuencias se usaron para diseñar conjuntos de 3 oligonucleótidos sintéticos para cada marcador, de acuerdo con el protocolo de genotipado múltiple GoldenGate® (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE. UU.; por ejemplo, véase Fan et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 68: 69-78, 2003; y Gunderson et al., Nature Genetics 37: 549-554, 2005). Estas secuencias también pueden usarse, como se conoce en la técnica, para diseñar ensayos análogos, por ejemplo, Ensayos TAQMAN, para identificación de marcadores.

Tabla 13. Secuencias de ADN genómico de *C. sativus* que flanquean los sitios de marcadores de SNP unidos a QTL 1, 2 o 4

Nombre del Marcador	Cromosoma; posición en el mapa	Secuencia de ADN genómico (SEQ ID NOS: 20-69). Sitio del SNP con el polimorfismo presentado entre paréntesis
NN0223782	2; 22,448	TTCATACGCCGTTGCAGCTGAAAAGTGGCAACCATTACTTCCAGATCATT ATGACAAATAAA[T/C]AACCAAGGCCACCTTCATGCATAAAATGGTAAGAT AATAGCAAGCTCTATACCTTCTTTTT
NN0225385	2; 27,538	TCTTGATCAATCCAACCTGGTTGGAACTCAAAATTCAAAGAAAATGGGGTTT AATCACAAACCA[T/C]GTTCAATCTCAATTTTCAGATTCCGCCATCCCCCC CACTCCCTATACTCAACCTCCTGAC
NN0226670	2; 30,115	GGTTAGATGAAAAGAAAGTATGCATTCATGCTTTTGCACAAAAGGCATTC CTGGCTTCAA[A/C]TAGCTGTATCTTTCAGGGGATATAAATGGATGCA ACACTTTTTTCAGTGAAGAAAATCC
NN0224124	2; 32,406	GGATCATTTATTTATCCAACGTATTAGCAAGCTCTAATAGAAAACACTTCC TAAAGAACATA[T/C]CGATCCAAATTTATATGCTAAGAGAAATACCCAAC ATTTGAGCAAGTTACTGACTACAGC
NN0246472	2; 38,441	TAGAAAACAAGAATGGTTCTCAAAGAACCCTACCGACCCGAATTGGTTGA GGATGAGATGAC[A/G]AATAGAAAACATTAATAATAATGTTGGAGGAGGA GGCGATCGATGAAACCCGTCGCAAGCAAT
NN0225358	2; 50,250	CCACGAATGGAAATCAATGAATTCACGAGCAACCTATAATAAGAGAGTG GAAAACAAAACT[A/G]CTCCTCACCACTAAGAACAACAATGTATAAAA ATCAGAGAAGGAAGATAAAGATACT
NN0227700	2; 55,622	GAAGAAGATGCAACAAGTAAGAGTCTGGCTGGGGGAGTTGAAAGTTCA TTCATGGATTAG[A/G]TTAACATACGAACCTTTGGAGCCGTGCAAAAAGAC AATCCCCATAACTTGATTACGGGCTTC
NN0224617	2; 57,989	AAAATATATGATCCTACAACTAAATAAGAGTGCACATGAAGATACCTTA TATATAGGAGA[T/C]AATGATGTCGTATGTCCTGCTTGTGATGATTTCCGAAG AACCAGATGACTGAAGAAGGAATAA
NN0247695	2; 66,466	GGAGTTAAATCGAAGGAAGAAAATCAACTCGTCTTTAACAGCATCACAAAT AATCAAATCTT[C/J]AGGTATACCTTCTCCTTGTCACTGGACTCAT CAGGATCCTCATCCGGGATTTTGGC

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma; posición en el mapa	Secuencia de ADN genómico (SEQ ID NOs: 20-69). Sitio del SNP con el polimorfismo presentado entre paréntesis
NN0227242	2; 73,201	CTCTGAAAGAATTACCGAAGGGGGTCCGGAATJTTTCTCTATAGCCCTGCAAT GAGAGGAATAA[J/C]GAGGAATGAAAATGTTGGCTCTGTAGCACATGAA TGAAAATGCCGATAATTTCTGCCAAAAGGC
NN0223824	2; 78,867	AGAACAAACCCCAACGTCACAAATCACATCATCTCCAACCCCTTCTTC TCCTCATCAT[J/C]AGTTTTAGTCTCTGTTTTGTGGAACTCTCAAATGAA ATTGCTTGAATACTCTTGATAAAA
NN0223181	2; 82,411	ACCAAAAATGAAAATAAAATCAGGCTCCACCTTCACCTTCAGTAAATATG ATGGCAGTACG[J/C]TGCAATGTAAACCATGTTAATAGAAAGAAAAGAAC TGTGAGAAAATACTAGAAATC
NN0226638	2; 88,353	CGGATGAGGATTTACAGGTGTTTTTCTAAACAAAATGTTTTGCCCTTTAAAC ATGCGTTTGC[C/G]GATCTGGTTTATTTGTTTTCGGTTGAT
NN0225012	4; 20,649	ACTATCCTAATACTACGGAAATGGTGTGGAGAACAGAACAGTTATTTGG TTTTGTTTCGAAA[A/G]TCTCGACAACCTTTCGATCGATCACTCTTGTAGGG GGTATCCCAACTACATCATAAAGCAA
NN0228579	4; 25,816	ACTCATAATTTACAGAAAACCTTACTCTAAACCACAAGTCTTAACAATA TATTTCTGCT[C/G]CGGCTCTCTTCCCTATCATGAAAATTTTGCAGCTATT CAGAAAATCC
NN0226451	4; 27,944	TGCTTCTTGATCTTGCTAATGTAAGAGATATCACTTACATGAAAAGGCTT TCCGAGTCA[J/C]GTCAATTTCTGCACCTGGAGGCTTTTGGTCATGTCTC TTGAATACCCACATCCCATATT
NN0225088	4; 30,428	GAGTTTCCAAAATTTGAACATCTTCAATGGACAGAAAAGTTTTTGAAGTAGC AAGACTTAAGG[J/C]TCCACTTGGTGTCTTATCTAAGTTCGGAACA ATTTGCATTTGATTTCTTAAATAAT
NN0226219	4; 32,977	TAATAGTTACATGATGCTTTTATGCTACTATATATGTTTCAGAAAATATTAT CCAGATGCGA[A/T]ATATTTTCAGACACTGCTGTGAATGTTATTTGGACT AACGAAAACCTTGTATTTTGTGCTG
NN0247551	4; 35,460	GTTTACATGAAAATAIGCACACACCCAAAAGATATGTTGATTAAGATGAT AAGTTCCCAAG[A/G]ATAGAAAGAAATATGTTGTTGTTGCTTCTTTGATGT CCAGGAACTAATGAGATTTATCTGG

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma; posición en el mapa	Secuencia de ADN genómico (SEQ ID NOs: 20-69). Sitio del SNP con el polimorfismo presentado entre paréntesis
NN0246357	4; 40,294	TATAGCCGAGCAACCGAGTCCTTAGATTGGTTTAAAGAGCATCTACGAA TAGATGGTCGA[T/C]TGTATGAAATGATGAGCAGAAAACGCTCTTTGAAAACG GCTTCnTCACATTTTGAACTCCATGCA
NN0225551	4; 46,640	TGATTTAICTCAITGGAGAATAACCAATGTGCAAAAGAAACCAAGGCGTT CTTCTTCATCT[A/G]TGTTAGCTTCGATATGTGTGTAGCACTGCANNN NNNNNN
NN0226732	4; 49,999	AGAAAATTTTAAAGACAATACTTGATATCCTTTTCCAAATTCAGTTCAAT CCTCCTATAA[T/C]TGTGATCCAGCAACGATTAGGAAATGATTTCTCAAT TCCCACCTTGGTGACATTTCAAG
NN0247689	4; 51,938	CTTTATTTTATTTTCAGGTTGCTTTAAAATTTGAGCACAGAAAATAGTAA GGJA/TJTGCAATTTATGTTCTCCATACGGAATGGCAAGTTTACAAAGTGAGT AACTTTTGGGTTACA
NN0247342	4; 54,495	GTACTTGTACCAATATGAAATGTGCACATGCGCTCTTGTCTAGATAAT ATGCACAGTTQJA/TJCTTAAAAGCTAAGCATAAGCCACAAAATCCAAGA ACCAATGTAACCAAAAACAGTATGGGA
NN0224702	4; 62,385	CTGTTGCCCTATGCAAAAGCATTTATACAGCTTCATTCGCCATTTTAAACGA ATGTTCACTGJA/TJAGTACCTGAGATGGCTTCCAAAACCTGTCTGTAAAGG TGTGCCCTCATCTGCATCTGCT
NN0225482	4; 66,478	TCTTTTATACTTTTCTGATCTTGTAAAAGTTTAAAGGTTTCAACTGGTGTA GTGTAGTCA[A/C]CAGAAAGTCTTTTATAAATGTTACACTTTAATTGATA GGAAAGTGTCTTTAA
NN0224538	4; 67,148	GCTAGTATACTATATATCTTTTGGAGGCTTTATGATAAATTATCAAAATG AAAGTTCTAG[C/G]TGTGATCAAGAGAAGATTCTTAGCCTACCTCTTA GCTCTTTTAAAAAATTGTGGTAGTT
NN0247543	4; 71,973	TAAntTTGTTTTCACATTTnTTnCAAAATAATATATATCTTACAGTTTAGG AGGCTTCTT[T/G]CACCATACATATAAACATATGGAACAAACATACC TCTAAATAACCAATAGACTTTTA
NN0224041	4; 75,834	TCTTTAAAAGAAAGCTTGAAGATGAAGAAAATTCAAAAATTTCAATCAAT TCGATCCCTCCJA/TJCTCACCTGAAAAAGTGGTTAATCTGATGATTTTA GATCAITGGTCCATTGATCCCTCAAT

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma; posición en el mapa	Secuencia de ADN genómico (SEQ ID NOs: 20-69). Sitio del SNP con el polimorfismo presentado entre paréntesis
NN0228853	4; 78,923	GTCCATACTACCATAATTGATAAATACTAAGTACCCGTGAACCTTTGAGATTTGAATCTTTC[G]JACCCACACAGGTTGTTAAACACAAATACGAGTAACA AAGATAAGATTGAACTCAGCCTTT
NN0227762	4; 85,871	TTGGTTCCTGATCCAGAAGAAAAATGGTTGATTTCCCTTATGATTCTTTTC AGTAAGGTGGI[A/G]JACAATCTTGTCCAGGTCCCTTCGTACATAAAAACACCC CCCTCCAAGGAGAGAAAACCCCAA
NN0227587	4; 87,395	ATTTTATAGATGTGAGCCCTATTTATGTGCTCTTAACTTCTCTTTTAGTAATG GTGGAAAATG[T/C]JAATTTGTTTATGAGCAATGGTATCGTGAATAAATGGT TGGATACATAATAGCTTTGCTTG
NN0228457	5; 25,235	GTTGGGCTTTTTTGTGTAATTTCTTTTTTGTGCGTATTATGTAATCTAAAG GCAGATGAA[A/G]JACCTGGATCATAATTTCTTTGGCAATGGATTTTGGCGTT GGTGTTGGGATTCCTTTTTCCA
NN0246356	5; 30,032	TTAAACAAATTGACCCAAAATTTAAAGTTGATGGGTAAAGGTAAAACTAA CATTATATCAC[A/G]JCAACATTCCTCATTTGTAGACTTGAATAATGTAG AAAAGCCATTAGTGAAAAATGAATA
NN0246332	5; 33,371	TATTTGGTGCTAACCGAATAGTTTGAGAGGGAGAAATAGGAAACGAT GACAACTCCATG[A/G]JATTTGGGGAAAGTTTCGACATTTGAAAAGGAGA ATAAATCAATTAATAATATGCATTCAA
NN0223399	5; 38,201	ACACAGTATTGATAAATTTCCAAATCAACACTTGGAAATATTTTGTAAAT ATGCACGACA[A/T]JATTTGGTTCGTTATTTGGTCCATGATGGTAATCTATA CTTTCATATGAAATCTTATCTCTA
NN0223689	5; 41,014	TATATGTTGCTAATGTGCTATTTTTTAAAGAAAAATAAAGGCCCCATTT GGTCAATGGTTT[C]JCTCTCAATTTGTTCAATTTGTACTTTCCACATTTATTG AATAAGCAATCCAACTTTTACCTA
NN0247731	5; 44,780	TGAAGAAAGAGCCTTTATTCGTCATCTGGAACCTCCTTTATCCATTTATC TTGAATTTGGTT[C]GGTCATGAACACACACCTTTACCATTTATTTCAATGC CATGATTTGCTTACACAGGTGTG
NN0226166	5; 49,540	AGTCGAGTTTTGAGCCACTCATAAACCAGTTGAAATGCTTTTAAACCTTGTA GTCACTAAACA[C/G]JAAACACAGTGGAAATGGTAGTTGAAGTAGGGTCATT TTGGCTAATTCATTGTCATGTTGTTA
NN0225480	5; 52,743	TGTCCAAAAGAAAATATATGCTCAAAACTGTGCTCAATCACCGTCTTCTCT CCAATTTCTC[C]JATATCATCTCGATTATTACTTTCTCTATTTCATTTA GTTCTAATAATAAATACGGC

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma; posición en el mapa	Secuencia de ADN genómico (SEQ ID NOS: 20-69). Sitio del SNP con el polimorfismo presentado entre paréntesis
NN0246411	5; 55,649	CCGAGGGACCTCCGGCTTGCCGTTACAAAGTTGGGAGTTGGCCCTTGG GCTCTGACGT/A/GJGGCCGAGAGTCCATTGCTCTAAAGATTGGTGGG CACCGCGTrnAGGCTGGTTCACAGAGC
NN0227759	5; 59,710	CTCTAGCCAAAATAATTCCATTTTGTTCACAAAATGAACCTGTTTGGGA GGGAAGACCAIC/GJGGCTACCCATCCCAAATTCAGATTCTGGAAAATA TGGCCAAAAGATCATTCATTGAGGTC
NN0247348	5; 61,450	ATGGAGCTTAGAGAAAACGACCTAGAAAATATTATCCTTATTTCATGTCCG AACGGCTGT[C/G]GTAAGATTAGTTGAGGTGGCATAAATACCTGGA CACTCACAAAATAAGmmAAAAAAAn
NN0228465	5; 68,021	ATAATGGAATATTTGACAACTAATTAGTTACTTCTAAAACCTGCAATAGCA GTCACGTTAGT[C/G]TCCCCCAGGGAGAGAAAATACTAGAAATTTGT GAGCCACTGTTAATAGATTCAAAAATA
NN0247786	5; 71,424	TTAGGTTCCCGCTATTGCAATACCAACAAGGCAATGAAGGCTTTC[G]GCC ACAAATGTGAAATCATCAACAGTTACTATGAACAATGAATTCGCTAACAG GAAAnCGT
NN0226645	5; 74,784	TCTAATTCGATGAGTTGTCTGAAATTCCCAAGTAAGAACCACAAAGTTCCA TTCATTCTC[A/G]AGCACAAAACCTTCCACCACAAAACATAACACCCTAAA TCTCTCCACATTCCTTCCCTTA
NN0223809	5; 76,617	GGAGATTGTTGCACGCTGAAGAAAAGCCTTCAGAAATTACCAATTAAGACT TCCCAAACCTCTGT[C]CTGCATATTGTCAAGAAAAGCTAGAGATTTTCTCAG AAGCTACTTTAATGGCAGGGCCCTC
NN0227071	5; 78,303	AGGAAAATAACCTTCCAATAGAAAACATGGTAAATGCAATAAGCATCTA GTTTCATCCAAT[C/G]CAAGGGTAATGGTAGTTCAAGATGGAACCTAAA ACTCTCAGAGTGTGTGTGCAATCCCTG
NN0226870	5; 80,340	GGTTACAGAGTCCAGAGCGCATCAATGGAGATTGTGGATGTTGAAGGTTTC AGAAAGAGAAAG[A/G]TCTGTTGATTAAGGAGGTCCTTCATTCTCCAGGTGC TGAACGACAGTACCTTCCGGAAATCTG
NN0228148	5; 82,273	ATGATCCTCAATTCATACCATATTTATTTGATGAGCTAAAATGTTGTATAAA GAAAAGGAAAGT[C]TATAGAAAGGATGGATTCTGTACATTAACACAAAAGG ATAAAAACCTGCAAACTTATTTATATA

Se seleccionaron plantas que contenían un alelo o alelos donantes resistentes al DM, incluidas las líneas GSP33-1094GY y GPN33-1093, entre otras (véanse las Tablas 1-8 y 14) para la reproducción adicional. Dependiendo de la estrategia de reproducción, las plantas seleccionadas para la reproducción posterior pueden ser homocigóticas o heterocigóticas para un alelo donante (resistente).

5

Tabla 14: Descripciones de las líneas: rasgos agronómicos seleccionados y de resistencia a la enfermedad para líneas adicionales con líneas de resistencia y comparación al DM introgresado

Líneas con un alto nivel de resistencia al DM										Genotipos marcadores								
Código de línea	Fuente de Semillas	Tipo	Patrón de floración	Partenocarpia	Planta sin amargo	CMV	Costra (Cladosp. cuc.)	PM (Sphaerotheca f.)	DM (Pseudop. cu.)	Lisa/Espinada	Color de la espina	CAPs_ENK59	CAPs_ENK60	CAPs_17179	CAPs_17170	CAPs_18229	CAPs_17563/66	Puntaje de DM media
05-346	NJ05 854-3	Encurtido, Partenocarp. espinada	G Y	Sí	Sí	1	1	2	2	Espinada	Blanco	B	B	B	A	A	B	1,8
GSP33-1094GY	NJ05 696-4	Encurtido, Partenocarp. lisa	G Y	Sí	No	2,5	5	1	2	Lisa	xxxxx	B	B	A	A	A	B	2,0
01-349	VJ02 322-6	Encurtido, Partenocarp. espinada	G Y	Sí	Sí	1,5	1	1	2	Espinada	Blanco	B	B	B	B	A	B	2,3
GPN33	VJ02 55-3	Encurtido, Polinizada espinada	G Y	No	No	3	5	2	2	Espinada	Blanco	B	B	A	A	A	B	1,8

Líneas susceptibles a DM			Genotipos marcadores															
Código de línea	Fuente de Semillas	Tipo	Patrón de floración	Partenocarpia	Planta sin amargo	CMV	Costra (Cladosp. cuc.)	PM (Sphaerotheca f.)	DM (Pseudop. cu.)	Lisa/Espinada	Color de la espina	CAPs_ENK59	CAPs_ENK60	CAPs_17179	CAPs_17170	CAPs_18229	CAPs_17563/66	DM media
05-110	VJ05 110-3	Encurtido, Partenocarp. lisa	G Y	Sí	Sí	2	1	1	4	Lisa	xxxxx	B	B	B	B	A	B	3,6
01-714	NJ05 684-4	Encurtido, Partenocarp. lisa	G Y	Sí	Sí	2	1	2	4	Lisa	xxxxx	B	B	B	B	A	B	4,1
05-779	VJ05 273-4	Partenocarp. de Riesenschal	G Y	Sí	Sí	5	5	5	5	Lisa	xxxxx	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 de longitud/espesor de 3,2. Se encontró que la línea GSP33-1094GY mostraba un fuerte vigor, con frutas bastante largas (relación de longitud/espesor de 3,3/3,4) y hojas algo erguidas con poca tendencia foliar. 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 de longitud/espesor 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/espesor promedio de las frutas fue de 3,3.

Ejemplo 5: Creación de poblaciones adicionales para mapear loci de resistencia al DM

Para identificar loci subyacentes a la resistencia del pepino al patógeno Moho Velloso (*Pseudoperonospora cubensis*), se generaron dos poblaciones de mapeo adicionales al cruzar cada uno de los dos progenitores susceptibles (API-45-5312-MO y VJ03-68-06) por el mismo línea resistente (PI197088). De cada uno de estos cruces, una sola planta F₁ fue autopolinizada para crear dos poblaciones F₂. Estas se codificaron como poblaciones "API" y "VJ", de los cruces API-45-5312-MO x PI197088 y VJ03-68-06 x PI197088, respectivamente. A partir de la generación F₂, se utilizó un procedimiento de descenso de una sola semilla para crear ~200 familias F₅ en cada una de las dos poblaciones. El proceso implicó la autopolinización de ~250 plantas F₂ en cada población para crear familias F₃. De cada familia F₃, una sola planta fue autopolinizada para crear familias F₄. De cada familia F₄, una sola planta fue autopolinizada para crear familias F₅. Cuando las plantas F₄ estaban creciendo, se recolectaron muestras de tejido de cada planta. Estas muestras se usaron para el aislamiento de ADN y el genotipado del marcador. Se analizaron múltiples plantas de cada una de las familias F₅ derivadas de cada planta F₄ para detectar reacciones a *Pseudoperonospora cubensis* en ensayos replicados de patología de múltiples ubicaciones (es decir, resistencia/susceptibilidad a la enfermedad) (véase el Ejemplo 6).

Ejemplo 6: Análisis de plantas de pepino en poblaciones adicionales para resistencia al DM

Los genotipos marcadores para cada planta F₄ de las poblaciones de mapeo descritas en el Ejemplo 5 se analizaron luego contra el rendimiento de las progenies F₅ en ensayos de resistencia/susceptibilidad a la enfermedad de DM, en una forma de rendimiento de genotipo progenitor frente a progenie. Las plantas de pepino de estas poblaciones se cultivaron en múltiples lugares, incluidos Turquía, Tailandia, Francia, Estados Unidos, Países Bajos e India, y se sometieron a bioensayos en condiciones de invernadero y/o de campo, para determinar el nivel de resistencia a la enfermedad del Moho Velloso causada por *P. cubensis*. Las pruebas de resistencia realizadas en algunos lugares utilizaron los protocolos descritos anteriormente, en los Ejemplos 1-2. Las pruebas de resistencia realizadas en Nimes, Francia y Turquía utilizaron un protocolo similar, sin embargo, por ejemplo, se usó un aislado de *P. cubensis* encontrado naturalmente en Boztepe, Antalya, Turquía, mientras que las pruebas en los Países Bajos y en Tailandia también utilizaron aislados de *P. cubensis* obtenidos localmente. Se realizaron pruebas en las poblaciones de mapeo con un panel de variedades de cultivo seleccionados del grupo que incluye: SMR58, Maram y Corona (altamente susceptible); Poinsett 76, Adefem (parcialmente resistente); Sweetslice (resistencia intermedia); y PI197088 (nivel más alto de resistencia) como controles. Las inoculaciones se realizaron en el invernadero utilizando hojas sueltas recién esporuladas, aproximadamente 6 días a 1 mes después de la siembra. Se realizaron hasta tres evaluaciones de cotiledones y de primera y segunda hojas aproximadamente 6-30 d después de la inoculación. Un ejemplo de escala de calificación de enfermedad se define de la siguiente manera:

- 1: Las hojas verdaderas o los cotiledones no muestran síntomas.
- 2: Las hojas o cotiledones son verdes, posiblemente algunas manchas cloróticas.
- 3: Las manchas necróticas no son confluentes; menos del 30% del área de cotiledones está afectada; las hojas tienen manchas cloróticas más grandes con necrosis en el centro.
- 4: 40% del área del cotiledón es necrótica; menos del 25% del área foliar es necrótica.
- 5: 50% del área del cotiledón es necrótica; menos del 50% del área foliar es necrótica, no coalescente.
- 6: 60% del área del cotiledón es necrótica; el área necrótica coalescente en el 25% de la superficie de la hoja.
- 7: 70% del área del cotiledón es necrótica; las áreas necróticas coalescentes cubren el 50% de la superficie de la hoja.
- 8: En los cotiledones y las hojas, solo el tejido cerca del peciolo sigue siendo verde.
- 9: Los cotiledones y las hojas son completamente necróticos.

Los niveles representativos de enfermedad en las líneas de control y en una población de mapeo se muestran en las Figuras 3-4.

Ejemplo 7: Procedimientos para el análisis de mapeo de QTL de poblaciones de plantas API y VJ

El análisis de mapeo de QTL se realizó sobre los datos obtenidos de pruebas de enfermedad en las dos poblaciones de mapeo adicionales derivadas de cruces con PI190788. Para la población API, se utilizaron 971 marcadores de SNP mapeados en 174 líneas genotipadas y fenotipadas. Para la población VJ, se usaron 964 marcadores de SNP mapeados en 168 líneas genotipadas y fenotipadas. Ejemplos de marcadores genéticos se enumeran en la Tabla 13, y la Figura 5 ilustra esquemáticamente las posiciones de estos marcadores que se localizan en los cromosomas 5, 4 y 2. Los análisis de mapeo de QTL se realizaron en QTL Cartographer v1.17 (Basten et al., 1994; y Basten et al., 2004). Los programas utilizados fueron: LRmapqtl, SRmapqtl, Mlmapqtl, MultiRegress, JZmapqtl. Las dos poblaciones x 6 ubicaciones (= 12 conjuntos de datos) se analizaron de forma independiente.

El mapeo de intervalos se realizó a intervalos de 1 cM usando LRmapqtl. Los parámetros utilizados para el programa fueron: M = 3; d = 1; c = 0; r = 0. El mapeo de regresión por etapas con selección directa seguida de eliminación inversa se realizó utilizando SRmapqtl. Los marcadores se incluyeron en el modelo en P <0,001 en la etapa de selección directa y se excluyeron del modelo para P > 0,001 para la etapa de eliminación. Los marcadores dentro de los 10 cM de los marcadores que ya están en el modelo se excluyeron de un análisis posterior. Los parámetros utilizados para el programa fueron: M = 2; F = 0,001; B = 0,001; u = 10.

El mapeo de intervalos múltiples se usó para buscar QTL múltiples en intervalos múltiples. JZmapqtl se utilizó por primera vez para estimar las frecuencias de genotipo a intervalos de 1 cM. Los parámetros utilizados para el programa fueron: l = 30; M = 9; d = 1. Luego se utilizó MultiRegress para estimar el conjunto inicial de QTL putativos utilizando pruebas de regresión por etapas para todos los intervalos de 1 cM para efectos aditivos y de dominancia y se incluye un QTL en el modelo inicial con P <0,0001. Los sitios de prueba dentro de los 20 cM de un QTL putativo ya incluido en el modelo se excluyen de un análisis posterior. Los parámetros utilizados para el programa fueron: c = 0; S = 0,0001; w = 10; u = 20; l = 30. Mlmapqtl se usó para probar y eliminar QTL putativos no significativos del modelo inicial identificado por MultiRegress (-l = sMPrtseC). En esta etapa, el número máximo de QTL está limitado a 5 (-q = 5), y un QTL putativo se elimina si el cambio en el criterio de información es <13,825 (correspondiente a 3 LOD). Luego se utilizó Mlmapqtl para refinar la posición de QTL (-l = sMPRtseC) y buscar cualquier QTL nuevo (-l = sMPrtseC). En esta etapa, el número máximo de QTL se limitaba a 5 (q = 5), y se agregaría un QTL putativo si el cambio en el criterio de información es > 13,825 (correspondiente a 3 LOD). También se realizó una búsqueda de interacciones epistáticas entre QTL putativos (l = sMPrtseC). En esta etapa, se incluiría un término epistático en el modelo si el cambio en el criterio de información fuera > 0,000. Todos los demás análisis, incluidos los análisis de los resultados de QTL Cartographer, se realizaron utilizando R (R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, 2009). Para la evaluación de los modos, enfermedad ~ QTL1 + QTL2 + QTL4.

Ejemplo 8: Resultados de mapeo de QTL para poblaciones API y VJ

Se identificó un total de 23 intervalos de QTL aparentes (intervalo de 2-LOD con picos de QTL de 5-LOD) en los experimentos de 2 poblaciones x 6 ubicaciones. Muchos de estos solapamientos entre poblaciones y/o ubicaciones, y tres QTL, denominados QTL 1, QTL 2 y QTL 4, mapeados a los cromosomas 5, 4 y 2, respectivamente, se identificaron para un análisis posterior. Los marcadores utilizados, junto con sus posiciones, se presentan en la Tabla 13, y las posiciones aproximadas en el mapa para los QTL también se presentan en la Tabla 15.

De particular interés son QTL 1 en el cromosoma 5 y QTL 2 en el cromosoma 4, que se identificaron en ambas poblaciones de mapeo cultivadas en al menos tres de las seis ubicaciones geográficas, lo que sugiere la robustez de estos dos QTL en diferentes entornos genéticos y condiciones ambientales. Los efectos alélicos aditivos individuales promedio son 0,62 (0,32 - 1,26) en QTL 1 y 0,62 (0,47 - 0,93) en QTL 2. Por lo tanto, es probable que una planta individual con ambos alelos resistentes en ambos QTL tenga una reducción en la calificación de la enfermedad de 0,62 x 2 + 0,62 x 2 = 2,48. Individualmente, la cantidad promedio de variación fenotípica explicada por cada uno de estos dos QTL es 24% (QTL 1) y 21% (QTL 2), con el 76% - 79% restante atribuible a otros efectos genéticos y ambientales (no genéticos).

Se identificó un efecto aditivo negativo (es decir, un genotipo resistente con una puntuación de enfermedad más alta) en el cromosoma 2, posición 21,8 - 73,8 cM en la población VJ cultivada en Turquía, correspondiente a QTL 4. También se identificó la misma QTL en esta misma población VJ cultivada en Nimes y Tailandia, pero el efecto aditivo fue positivo. Por lo tanto, el efecto aditivo negativo identificado en el conjunto de datos de Turquía probablemente no es un artefacto, sino que sugiere la presencia de genotipo x efectos ambientales.

Tabla 15: Resumen de los resultados del mapeo de intervalos para dos poblaciones de mapeo en 6 ubicaciones.

QTL #	Crom.	Intervalo aprox. (cM)	Población de mapeo	Numero de ubicaciones	Efectos aditivos	R ²
1	5	22,6 - 81,0 (58.4)	Ambas	6	0,32 - 1,27	12 - 39%
2	4	37,7 - 87,6 (49.9)	Ambas	3	0,47 - 0,93	13 - 28%
4	2	21,8 - 73,8 (52.0)	VJ	3	-0,49 - 0,61	12 - 20%

Los intervalos de QTL que se muestran en la Tabla 15 se identificaron mediante el mapeo de intervalos. Cada intervalo está marcado por un identificador único (QTL #) con ubicación cromosómica en un mapa genético de consenso de pepino (por ejemplo, Ren et al., 2009) indicado. Los intervalos de QTL pueden identificarse en una o ambas poblaciones de mapeo API y VJ y en una a seis de las seis ubicaciones geográficas en las que se realizaron las pruebas. También se indica el intervalo de efectos alélicos aditivos y la proporción de variación fenotípica atribuible a la QTL correspondiente (R^2).

Los ejemplos de marcadores de SNP que se mapean a tres QTL (denominados QTL 1, 2 y 4) que se identificaron se enumeran en la Tabla 13. Estos QTL se mapean, respectivamente, en los cromosomas 5, 4 y 2. De 23 intervalos de QTL putativos identificados mediante el enfoque de mapeo de intervalos, cuyos ejemplos se muestran en las Tablas 16 y 21, también se identificaron mediante un enfoque de regresión por etapas que utiliza la eliminación directa-selección-inversa. Los dos QTL putativos que no se corroboraron no correspondían ni a QTL 2 en el cromosoma 4 ni a QTL 1 en el cromosoma 5.

Para estimar los efectos de la unión de múltiples QTL en intervalos múltiples, se realizó un mapeo de intervalos múltiples para todos los conjuntos de datos. Los resultados nuevamente identificaron QTL 1 (mapeo al cromosoma 5) y QTL 2 (mapeo al cromosoma 4). QTL 1 se identificó en las ubicaciones API y VJ cultivadas en la mayoría (5/6) de las ubicaciones (Tabla 17), lo que sugiere que este intervalo de QTL es robusto en vista de los antecedentes genéticos y las diferencias ambientales. Por el contrario, QTL 2 se identificó en la población API cultivada en tres de los lugares y en la población de mapeo VJ cultivada en Turquía (Tabla 17), lo que sugiere que el efecto de este QTL puede depender del ambiente genético.

En contraste con QTL 2, QTL 4 en el cromosoma 2 se identificó a partir de la población VJ cultivada en tres de las seis ubicaciones y en la población API cultivada solo en Turquía. Esto sugiere que mientras QTL 2 puede ser específico para el ambiente de API, QTL 4 puede ser específico para el ambiente de VJ. Curiosamente, el efecto alélico de QTL 4 se vuelve negativo cuando QTL 2 también está en el modelo (en ambas poblaciones de mapeo cultivadas en Turquía), posiblemente sugiriendo (1) un efecto opuesto entre QTL 2 y QTL 4, o (2) que el efecto negativo en QTL 4 es específico para las condiciones ambientales encontradas en el sitio de prueba en Turquía. La evaluación del modelo: enfermedad \sim QTL1 + QTL2 + QTL4 para los otros conjuntos de datos sugiere que los tres QTL deberían tener efectos aditivos positivos (también véase la Tabla 18), lo que implica que la segunda explicación es más probable.

Las interacciones epistáticas solo se identificaron en los dos conjuntos de datos de Turquía y solo se identificaron efectos aditivo por aditivo. Las interacciones fueron entre los principales intervalos de QTL: QTL1, QTL2 y QTL4. Debido a que la interacción epistática solo se identifica en los datos de Turquía y debido a que el efecto negativo de QTL4 en este conjunto de datos, en este punto, no está claro si los efectos negativos aditivo x aditivo entre QTL1 y QTL2 también son específicos de Turquía.

Tabla 16: QTL identificados por mapeo de intervalos múltiples para las dos poblaciones de mapeo cultivadas en seis ubicaciones

Población	Conjunto de datos	Ubicación	QTL1	QTL2	QTL4	QTL1 x QTL2	QTL2 x QTL4	R^2
VJ	1	Turquía	0,61	0,47	-0,46	-0,23		0,67
	2	Nimes	0,58		0,36			0,52
	3	Tailandia	0,59		0,65			0,29
	4	Países Bajos						0,16
	5	India	0,47					0,36
	6	Felda	1,28					0,33
API	7	Turquía	0,47	0,57	-0,45	-0,22	0,23	0,56
	8	Nimes	0,69	0,49				0,66
	9	Tailandia	0,74	0,90				0,47
	10	Países Bajos	0,32					0,15
	11	India	0,52					0,32
	12	Felda						--

Entre un total de ocho intervalos de QTL únicos identificados por al menos uno de los experimentos, los QTL 1, 2 y 4 se muestran en las Tablas 16-17, y sus ubicaciones genéticas correspondientes se indican en la Tabla 15. En la Tabla 16, la última columna, R^2 , es la proporción estimada de variación fenotípica observada explicada por el modelo genético. Para los conjuntos de datos 2, 4, 5 y 8 de la Tabla 16, se incluyeron QTL putativos menores en el análisis de la proporción de variación observada explicada por los QTL (columna) en el modelo del experimento (fila) y los

valores numéricos son los efectos alélicos aditivos estimados (aditivo x aditivo en el caso de QTL1 x QTL2, o QTL2 x QTL4).

5 Secuencias genómicas de clones de ADN de pepino que contienen el marcador genético RAPD CAPS_ENK59, entre otros, tal como el que se usó para identificar el QTL de resistencia al DM descrito en el Ejemplo 3, Tablas 10-11, y la Figura 1, se alinearon con un mapa genómico de pepino para determinar su ubicación dentro del genoma del pepino. Las secuencias se alinearon utilizando Sequencher (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, EE. UU.), y se encontraron dentro de 13 cóntigos (11 loci completamente ensamblados y 1 locus ensamblado en dos cóntigos).
 10 Luego, estas secuencias se alinearon en un mapa de andamios de secuencia física genómica de pepino usando BLAST y GMAP (Genentech, South San Francisco, CA, EE. UU.), con las posiciones del marcador RAPD (convertidas a CAPS) en el mapa físico-genético integrado basado en similitud de secuencia. Además, los marcadores CAPS_ENK59, UBC12-1200 y AL10-850, que se encontraron vinculados con el QTL definido originalmente en los experimentos de mapeo anteriores basados en el análisis de QTL de líneas derivadas de un cruce Lucinde x PI197088 como se describe en el Ejemplo 3, también se siguieron en las nuevas poblaciones de mapeo API y VJ para determinar dónde se localizaron en relación con los QTL recién identificados. Ambos enfoques
 15 dieron como resultado el hallazgo de que el QTL identificado originalmente del Ejemplo 3 se localiza conjuntamente con QTL 1 y se mapea al cromosoma 5, como se muestra en la Figura 5) El marcador NN0246677 mapea alrededor de la posición 43,8 o 47,8 respectivamente, de los mapas de cromosomas derivados de API y VJ respectivos de la Figura 5, bien dentro del QTL genéticamente definido. Aunque esta es una distancia genética de CAPS_ENK59 que se utilizó en el trabajo inicial, los marcadores identificados como segregados conjuntamente con este QTL (es decir, QTL 1) se identificaron en diferentes poblaciones de mapeo, y en particular, el trabajo inicial genotipado, tenía menos marcadores y menos réplicas de ensayos de fenotipado que las utilizadas posteriormente con los marcadores de SNP tales como NN0246677. Por lo tanto, la población de mapeo original incluyó menos eventos de recombinación, lo que permitió que los marcadores más distantes se retengan con mayor frecuencia en un bloque
 20 de enlace que mostró una asociación significativa con un QTL de resistencia al DM. Los análisis de QTL en diferentes poblaciones también tuvieron diferentes niveles de significación estadística, lo que resultó en posiciones en el mapa algo diferentes.

30 También se identificaron QTL putativos adicionales específicos para varias combinaciones de población de mapeo y ubicación geográfica, pero la falta de replicación en la ubicación y/o población de mapeo potencialmente sugiere que estos QTL contribuyen demasiado poco a la variación fenotípica general para la detección replicable.

En la Tabla 17 se muestra un resumen de los resultados del mapeo de intervalos, con intervalos de 2-LOD con picos de QTL de 4-LOD para cada una de las 2 población par 6 experimento de ubicación. Crom: cromosoma; Desde: posición izquierda del intervalo de 2-LOD en cM; Hasta: posición derecha del intervalo de 2-LOD en cM; LR: relación de probabilidad entre las hipótesis alternativas (H3) y nula (HO), en las que H3 = presencia de un QTL con efectos alélicos aditivos y dominantes en el sitio de prueba y HO = sin QTL en el sitio de prueba); a: efecto alélico aditivo; d: efecto alélico dominante; R²: proporción de la variación explicada por el QTL putativo en el sitio de prueba, SR: si el mismo QTL fue detectado por el enfoque de regresión por etapas; MIM: si el QTL putativo fue detectado por el
 35 enfoque de mapeo de intervalos múltiples.
 40

Tabla 17: Resultados del mapeo de intervalos

Población	Ubicación	Crom	Desde	Hasta	LR	a	d	R ²	SR	MIM
VJ	Nimes	2	21,77	66,48	21,53	0,41	0,23	0,12	Y	Y
VJ	Turquía	2	39,45	48,76	36,46	-0,48	0,14	0,20	Y	Y
VJ	Tailandia	2	46,76	73,80	28,79	0,61	-0,58	0,16	Y	Y
VJ	Turquía	4	37,65	73,98	32,79	0,47	-0,02	0,18	Y	Y
API	Nimes	4	46,65	71,65	38,00	0,56	0,18	0,22	Y	Y
API	Turquía	4	55,82	79,93	43,23	0,53	-0,27	0,22	Y	Y
VJ	Tailandia	4	57,50	87,57	21,85	0,58	-0,08	0,13	Y	-
API	Tailandia	4	74,98	81,98	51,79	0,93	0,25	0,28	Y	Y
API	Turquía	5	22,58	56,40	27,88	0,43	-0,42	0,16	Y	Y
API	India	5	26,64	30,31	59,67	0,52	0,15	0,32	Y	Y
API	Países Bajos	5	33,84	77,66	24,21	0,32	-0,13	0,15	Y	Y
VJ	Tailandia	5	40,37	55,81	20,24	0,55	0,22	0,12	Y	Y
API	Tailandia	5	44,71	56,40	34,46	0,79	0,55	0,22	Y	Y
API	Nimes	5	44,71	55,40	70,72	0,71	0,04	0,39	Y	Y
VJ	Nimes	5	46,19	55,81	45,75	0,61	0,13	0,25	Y	Y
VJ	Turquía	5	53,10	80,70	51,56	0,57	0,29	0,27	Y	Y
VJ	India	5	53,10	80,95	35,43	0,45	0,13	0,19	Y	Y
VJ	Felda	5	76,71	80,95	58,81	1,26	0,48	0,33	Y	Y

La regresión lineal también se utilizó para calcular los coeficientes de enfermedad explicados por el modelo QTL1 + QTL2 + QTL4 (véase la Tabla 18). A diferencia de QTL Cartographer, que siempre compara el cambio en el fenotipo con la línea resistente, los valores del coeficiente de la Tabla 19 se mapean directamente al cambio en la calificación de la enfermedad de 1 (resistente) a 9 (susceptible). Por lo tanto, un coeficiente positivo implica un aumento en la susceptibilidad.

5

Tabla 18: Coeficientes de enfermedad obtenidos mediante regresión lineal

Población	Ubicación	Intercepto	QTL1	QTL2	QTL4
VJ	Turquía	8,6	-0,56	-0,41	0,45
VJ	Tailandia	8,8	-0,28	-0,51	-0,46
VJ	Nimes	8,9	-0,51	-0,29	-0,39
VJ	Países Bajos	6,3	-0,12	-0,03	-0,05
VJ	India	9,6	-0,44	-0,15	-0,13
VJ	Felda	9,4	-1,26	-0,20	-0,08
API	Turquía	8,1	-0,40	-0,54	0,40
API	Tailandia	7,0	-0,55	-0,65	0,06
API	Nimes	6,9	-0,54	-0,37	-0,01
API	Países Bajos	5,5	-0,22	0,05	-0,02
API	India	9,2	-0,38	-0,18	0,09
API	Felda	6,6	-0,05	-0,54	0,31

Ejemplo 9: Alineación de marcadores de SNP con el mapa genético del pepino basado en SSR

10

Para el mapeo de QTL en relación con marcadores adicionales, los marcadores de SNP de la Tabla 13 se alinearon con marcadores de SSR que fueron utilizados por Ren et al., (PLoS ONE 4: e5795, 2009; doi: 10.1371/journal.pone.0005795) mediante un enfoque informático. Primero, las secuencias de cebador de 16-25 pb que definen los marcadores de SSR de Ren et al., se alinearon con las correspondientes secuencias de andamio de pepino (fragmentos genómicos) usando BLAST. Las alineaciones perfectas que cubren pares de secuencias de cebadores enteros (es decir, cebadores directos e inversos) se filtraron para eliminar cualquier alineación perfecta aparente que no sugiriera que los cebadores directos e inversos se enfrentaran adecuadamente, y las posiciones restantes del andamio se fusionaron con la información del mapa basada en SSR. 574 marcadores SSR se mapearon putativamente con 591 secuencias de fragmentos genómicos del andamio, ya que, como se esperaba, algunas secuencias de SSR se mapearon hasta una ubicación de andamio >1. Usando un umbral de diferencia de tamaño de menos de o igual a 50 pb para la diferencia entre las ubicaciones del cebador de SSR directo e inverso informadas y la distancia mapeada de acuerdo con lo indicado por las secuencias del andamio, 550 marcadores de SSR (con 566 ubicaciones mapeadas) se consideraron mapeadas en forma confiable. Estos datos de SSR se clasificaron luego con ID de andamio y se fusionaron con posiciones conocidas de otros marcadores internos disponibles. Finalmente, se observaron posiciones inconsistentes de marcadores, y las posiciones genéticas restantes de SSR se anclaron a un mapa genético/físico de consenso que se había construido utilizando marcadores de SNP y secuencias de andamio genómico. La Tabla 19 enumera las posiciones en el mapa de los marcadores de SNP y SSR de los cromosomas 2, 4 y 5, que pueden compararse directamente con el mapa genético de Ren et al., (2009). SSR y otros marcadores públicos enumerados en negrita en la Tabla 19 se mapean a las regiones de QTL identificadas, o son aproximadamente de 10 cM o menos de dicha región, y se espera que se segreguen conjuntamente con la resistencia al DM. El mapeo de los marcadores de SNP y de SSR que se enumeran en la Tabla 19 permite la identificación, usando un mapa genético disponible públicamente, de marcadores genéticos adicionales (por ejemplo, disponibles públicamente) que se mapean a una región genómica vinculada a la resistencia al Moho Velloso. En la Tabla 19, el QTL de resistencia al DM del cromosoma 2 se define como aquel que abarca la región definida por el marcador de SNP NN0223892 (posición en el mapa 22,3), hasta el marcador de SNP NN0226638 (posición en el mapa 88,4). El QTL de resistencia al DM del cromosoma 4 se define como aquel que abarca la región definida por el marcador de SNP NN0227442 (posición en el mapa 20,6), hasta el marcador de SNP NN0227285 (posición en el mapa 87,4). El QTL de resistencia al DM del cromosoma 5 se define como aquel que abarca la región definida por el marcador de SNP NN0226553 (posición en el mapa 25,3), hasta el marcador de SNP NN0226391 (posición en el mapa 82,1).

40

Tabla 19: Posiciones del mapa genético de SNP ("NN0 ...") y marcadores de SSR de los cromosomas 2, 4 y 5 del pepino, desde la alineación de los marcadores de SSR sobre el mapa genético de consenso basado en el andamio. Véase también la Figura 5

Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0226713	2	0,0
NN0246869	2	1,3
NN0227534	2	1,5
NN0228688	2	1,5

ES 2 804 457 T3

NN0224222	2	1,6
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0225653	2	1,6
NN0227319	2	1,6
NN0247117	2	1,6
NN0223201	2	1,6
NN0246545	2	2,8
NN0247432	2	2,8
NN0225708	2	3,3
NN0224023	2	3,3
NN0225478	2	3,7
NN0225481	2	3,7
NN0247128	2	3,9
NN0247110	2	4,2
NN0228683	2	4,6
NN0247397	2	4,6
NN0229107	2	5,0
SSR11952	2	5,9
NN0227776	2	5,9
NN0225556	2	5,9
NN0225149	2	5,9
NN0247714	2	6,9
NN0226409	2	7,0
NN0247374	2	7,0
NN0225817	2	7,2
SSR21090	2	7,5
NN0228345	2	7,5
NN0224358	2	8,1
NN0224778	2	8,1
NN0247591	2	8,8
NN0246816	2	9,7
NN0226190	2	10,2
NN0225911	2	10,2
NN0224313	2	10,5
NN0224822	2	10,7
NN0225831	2	12,1
NN0224132	2	12,1
NN0224585	2	12,2
NN0224551	2	12,2
NN0226478	2	12,2
NN0226856	2	12,2
NN0228321	2	12,2
NN0225656	2	12,2
NN0246405	2	12,3
NN0247003	2	12,8
NN0226751	2	12,8
SSR00684	2	13,0
NN0229051	2	13,0
NN0247367	2	13,0
SSR16226	2	14,2
NN0225537	2	14,2
SSR03070	2	14,2
NN0225564	2	14,2
NN0246551	2	14,5

ES 2 804 457 T3

NN0224243	2	14,5
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
SSR00204	2	14,5
NN0223995	2	14,5
NN0246378	2	14,6
NN0228099	2	14,9
NN0227372	2	15,5
NN0246337	2	19,0
SSR00289	2	19,7
NN0227840	2	19,7
NN0227646	2	20,0
NN0228476	2	20,3
NN0224590	2	20,8
NN0228237	2	20,8
NN0247575	2	20,8
NN0227530	2	20,8
NN0227574	2	20,8
NN0224794	2	20,9
NN0224612	2	21,2
NN0224686	2	21,2
NN0224467	2	21,3
NN0228820	2	21,3
NN0225896	2	21,8
NN0223892	2	22,4
NN0223782	2	22,4
NN0227357	2	22,7
SSR22083	2	22,7
NN0227327	2	22,7
NN0247569	2	23,9
NN0223579	2	23,9
NN0226747	2	24,3
SSR23832	2	24,9
NN0226337	2	24,9
NN0227615	2	25,4
NN0226084	2	25,4
SSR23220	2	25,4
NN0226279	2	26,5
NN0224105	2	26,5
SSR23420	2	26,5
NN0225385	2	27,5
NN0246831	2	28,8
NN0228374	2	28,8
NN0223545	2	29,2
NN0224897	2	29,2
NN0226707	2	29,5
NN0226670	2	30,1
SSR01374	2	30,1
SSR22338	2	30,1
NN0223657	2	30,1
NN0247784	2	30,7
NN0225380	2	30,7
NN0223661	2	30,7
NN0247123	2	30,7
NN0228011	2	32,1

ES 2 804 457 T3

NN0228058	2	32,1
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0224124	2	32,4
NN0246849	2	33,5
NN0226619	2	33,7
NN0247070	2	34,7
NN0226477	2	35,3
NN0223707	2	35,5
NN0227659	2	35,5
NN0227441	2	35,5
NN0223443	2	35,5
NN0223203	2	35,5
NN0226267	2	35,7
NN0224422	2	36,1
NN0227137	2	36,6
NN0246472	2	38,4
NN0224359	2	38,4
NN0228139	2	38,7
NN0227805	2	43,5
NN0247413	2	43,5
NN0223478	2	43,8
SSR02569	2	43,8
SSR07108	2	43,8
NN0227538	2	43,8
NN0247197	2	44,4
SSR11512	2	44,4
NN0226250	2	45,0
NN0224063	2	45,3
NN0228486	2	45,3
NN0224233	2	45,3
NN0223285	2	45,3
NN0223271	2	45,3
SSR00218	2	50,3
NN0225358	2	50,3
NN0224573	2	51,6
NN0226986	2	51,6
NN0224027	2	51,7
NN0228028	2	51,7
SSR17814	2	52,8
SSR12083	2	52,8
NN0225190	2	52,8
NN0246702	2	53,3
NN0224844	2	53,9
SSR16941	2	55,5
SSR11468	2	55,5
SSR22227	2	55,5
NN0227695	2	55,5
NN0227700	2	55,6
NN0228748	2	56,1
NN0246318	2	56,4
NN0247210	2	56,4
SSR02634	2	56,4
NN0223380	2	56,4
NN0223398	2	56,4

ES 2 804 457 T3

NN0247233	2	56,9
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0246696	2	57,4
NN0223463	2	57,6
SSR23732	2	57,6
NN0223494	2	57,6
NN0223465	2	57,7
NN0224617	2	58,0
NN0224658	2	58,3
SSR05492	2	59,5
NN0246763	2	59,5
NN0224594	2	60,9
SSR02322	2	66,5
SSR07278	2	66,5
SSR11909	2	66,5
SSR16135	2	66,5
SSR22653	2	66,5
NN0247695	2	66,5
SSR00009	2	67,0
SSR06913	2	67,0
NN0227962	2	67,0
NN0226717	2	67,1
NN0247305	2	67,2
NN0226038	2	68,0
NN0225776	2	68,5
NN0247544	2	69,7
NN0227412	2	69,8
NN0247350	2	69,9
NN0247798	2	70,0
SSR13131	2	70,0
NN0228560	2	70,0
NN0226406	2	72,4
SSR21734	2	73,2
NN0227242	2	73,2
SSR00507	2	73,7
NN0247636	2	73,7
NN0226006	2	73,8
SSR15873	2	74,6
NN0225709	2	74,6
NN0224913	2	74,6
SSR12227	2	76,3
SSR18362	2	76,3
NN0228448	2	76,3
SSR21655	2	78,0
SSR05420	2	78,0
SSR19851	2	78,0
NN0225027	2	78,0
NN0225018	2	78,0
NN0227692	2	78,5
NN0247139	2	78,5
NN0223317	2	78,8
NN0223824	2	78,9
NN0223452	2	79,5
NN0246284	2	79,7

ES 2 804 457 T3

NN0246771	2	79,7
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0223209	2	79,7
NN0223221	2	79,7
NN0226547	2	79,8
NN0247618	2	80,3
SSR01253	2	80,5
NN0228741	2	80,5
NN0226471	2	80,5
NN0226327	2	81,0
NN0226885	2	81,6
NN0246708	2	81,6
NN0228685	2	81,6
NN0228974	2	81,7
NN0246681	2	82,1
NN0226957	2	82,4
NN0223181	2	82,4
SSR21276	2	83,0
NN0227214	2	83,0
NN0225257	2	84,4
NN0223574	2	85,8
NN0226638	2	88,4
NN0226673	2	88,5
NN0228750	2	88,6
NN0246924	2	90,4
SSR30665	2	91,5
NN0224981	2	91,5
NN0224804	2	91,5
SSR13754	2	96,1
SSR16462	2	96,1
NN0223703	2	96,1
SSR16028	2	96,1
NN0247710	4	0,0
NN0247539	4	0,0
NN0247697	4	0,4
SSR07782	4	0,4
NN0228009	4	0,4
NN0224680	4	0,7
NN0226973	4	2,4
SSR01949	4	4,1
SSR07209	4	4,1
NN0247583	4	4,1
NN0228802	4	4,1
SSR19115	4	4,4
NN0246810	4	4,4
NN0228736	4	4,4
NN0247706	4	5,2
SSR14498	4	5,2
NN0225810	4	6,3
NN0224596	4	6,3
NN0225493	4	6,3
NN0247492	4	6,6
SSR19380	4	9,6

ES 2 804 457 T3

SSR21062	4	9,6
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0225975	4	9,6
SSR22231	4	9,6
NN0224796	4	9,8
NN0224711	4	9,8
NN0228893	4	9,8
SSR11074	4	12,5
SSR17427	4	12,5
NN0223763	4	12,5
NN0225383	4	14,4
NN0228856	4	14,5
NN0228862	4	14,5
NN0246870	4	20,0
NN0225260	4	20,3
SSR00012	4	20,6
NN0227442	4	20,6
NN0223863	4	20,6
NN0225012	4	20,6
SSR17024	4	21,7
NN0226079	4	21,7
NN0247573	4	21,7
NN0228250	4	21,9
NN0246309	4	22,1
NN0246393	4	24,6
NN0229054	4	25,4
NN0225572	4	25,5
SSR13023	4	25,5
NN0228579	4	25,8
SSR22706	4	25,8
NN0225143	4	25,8
NN0224450	4	26,8
NN0226440	4	27,9
NN0226451	4	27,9
NN0223404	4	28,7
NN0226964	4	28,7
NN0225345	4	29,7
NN0226204	4	29,8
NN0223589	4	29,8
NN0227018	4	29,9
NN0247182	4	30,1
NN0227010	4	30,1
NN0247596	4	30,1
NN0226074	4	30,1
SSR02803	4	30,4
SSR07236	4	30,4
NN0225088	4	30,4
NN0225150	4	30,4
NN0224867	4	30,5
NN0224838	4	30,5
NN0224343	4	30,5
SSR21240	4	30,5
SSR33769	4	30,5
NN0229028	4	30,5

ES 2 804 457 T3

NN0224864	4	30,5
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0227999	4	31,3
NN0228029	4	31,3
NN0227972	4	31,5
NN0224664	4	31,9
NN0223316	4	31,9
NN0224593	4	31,9
NN0247603	4	31,9
SSR16892	4	33,0
NN0226218	4	33,0
NN0226219	4	33,0
NN0247330	4	33,0
NN0224445	4	33,9
NN0227979	4	33,9
NN0224221	4	34,4
NN0223413	4	35,3
NN0224932	4	35,5
NN0224414	4	35,5
NN0224320	4	35,5
NN0228842	4	35,5
NN0228836	4	35,5
NN0247551	4	35,5
NN0227183	4	35,5
NN0247666	4	35,6
NN0227879	4	35,8
NN0224535	4	35,8
NN0246369	4	35,8
NN0223339	4	35,8
SSR01904	4	36,5
SSR16847	4	36,5
NN0223895	4	36,5
NN0228796	4	37,3
SSR19044	4	37,3
NN0223620	4	37,5
NN0247100	4	37,6
NN0247134	4	37,6
NN0246357	4	40,3
NN0246914	4	40,3
NN0225107	4	40,5
SSR15731	4	42,1
SSR21644	4	42,1
NN0247712	4	42,1
NN0224464	4	42,6
NN0228630	4	43,2
NN0224762	4	43,4
NN0224390	4	44,5
NN0229090	4	44,5
NN0247725	4	45,8
NN0246832	4	46,0
NN0224211	4	46,0
NN0225000	4	46,5
NN0225070	4	46,6
NN0225551	4	46,6

ES 2 804 457 T3

NN0247208	4	47,4
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0225339	4	48,1
SSR04385	4	49,5
NN0228715	4	49,5
NN0228035	4	49,8
NN0226692	4	49,9
NN0224961	4	49,9
NN0226732	4	50,0
NN0227475	4	50,3
NN0225125	4	50,3
NN0226656	4	50,5
NN0227120	4	50,5
NN0227873	4	50,5
NN0223888	4	50,5
NN0229056	4	50,5
NN0247743	4	50,5
NN0228883	4	50,8
SSR11043	4	51,9
NN0247689	4	51,9
NN0223084	4	53,7
SSR13456	4	53,7
NN0225084	4	53,9
NN0226586	4	53,9
NN0247529	4	54,5
SSR17270	4	54,5
NN0247635	4	54,5
NN0247342	4	54,5
NN0247771	4	54,5
NN0228536	4	54,8
NN0223375	4	56,2
NN0226446	4	56,9
NN0224702	4	62,4
NN0224353	4	62,4
NN0227422	4	62,4
NN0228031	4	62,4
NN0227154	4	62,4
NN0223414	4	62,4
NN0224265	4	65,5
SSR05125	4	65,9
SSR07130	4	65,9
NN0224287	4	65,9
NN0226863	4	66,0
NN0228562	4	66,0
NN0224234	4	66,0
NN0247077	4	66,0
NN0225482	4	66,5
NN0225553	4	66,5
NN0224572	4	66,9
NN0224106	4	66,9
NN0224111	4	66,9
NN0228930	4	66,9
NN0223654	4	66,9
NN0225081	4	67,1

ES 2 804 457 T3

NN0223940	4	67,1
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0227048	4	67,1
NN0246425	4	67,1
NN0224538	4	67,1
NN0228639	4	68,1
SSR21501	4	69,1
NN0225543	4	69,1
NN0228032	4	69,1
NN0226556	4	69,1
NN0226509	4	69,9
NN0227631	4	71,0
NN0227617	4	71,0
NN0223626	4	71,6
NN0223094	4	71,6
NN0223832	4	71,6
NN0247543	4	72,0
NN0224652	4	74,4
SSR07269	4	74,4
NN0224067	4	75,8
NN0226776	4	75,8
NN0227379	4	75,8
NN0227315	4	75,8
NN0224041	4	75,8
SSR00299	4	75,8
NN0228602	4	75,8
NN0223124	4	76,6
NN0223103	4	77,5
NN0225814	4	78,5
NN0228853	4	78,9
NN0227015	4	78,9
NN0223942	4	79,9
NN0246738	4	81,7
NN0224495	4	82,0
SSR01552	4	84,4
NN0225766	4	84,4
NN0247668	4	84,4
SSR22948	4	84,4
NN0226086	4	84,4
SSR04534	4	84,4
NN0223539	4	84,6
NN0227261	4	84,6
NN0227251	4	84,6
NN0226226	4	85,1
NN0246452	4	85,7
NN0226543	4	85,9
NN02277 62	4	85,9
NN0247486	4	85,9
SSR07550	4	86,2
NN0224069	4	86,2
NN0227587	4	87,4
NN0227182	4	87,4
NN0227279	4	87,4
NN0227285	4	87,4

ES 2 804 457 T3

NN0247726	4	87,6
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
SSR13159	4	87,6
NN0247782	4	87,6
NN0225419	4	88,0
NN0227265	4	88,0
NN0223422	4	88,2
NN0246417	4	88,2
NN0247615	4	88,7
NN0247555	4	88,7
NN0227211	4	88,7
SSR07543	4	89,4
NN0226481	4	89,4
NN0226465	4	89,6
NN0224223	4	90,0
NN0226865	4	90,0
SSR17406	4	91,3
NN0228648	4	91,3
SSR14257	4	91,3
NN0225826	4	91,6
NN0224777	4	92,0
NN0224050	4	92,4
NN0227419	4	92,9
NN0228716	4	92,9
NN0223906	4	92,9
NN0227718	4	94,3
SSR16315	4	94,3
NN0227942	4	94,5
NN0247421	4	94,5
NN0225077	4	94,5
NN0223715	4	94,5
NN0223710	4	94,5
NN0228566	4	94,7
NN0225541	4	94,7
NN0225476	4	94,7
NN0227586	4	95,7
NN0225015	4	96,5
NN0228246	4	96,6
SSR02233	4	96,7
NN0225079	4	96,7
NN0226312	4	96,7
NN0227403	4	96,7
SSR23770	4	96,7
NN0223754	4	97,3
NN0223896	4	97,5
NN0226628	4	97,8
NN0225404	4	98,0
NN0225471	4	98,0
NN0224793	4	98,0
NN0226220	4	98,0
NN0225734	4	98,1
NN0226011	4	98,2
NN0225208	4	98,2
NN0228805	4	98,2

ES 2 804 457 T3

NN0223571	4	98,4
(continuación)		
Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0224125	4	98,4
NN0224127	4	98,4
NN0246631	4	98,4
SSR16292	4	98,9
SSR29080	4	98,9
NN0246416	4	98,9
NN0246722	4	99,7
NN0246308	4	99,7
NN0247688	4	99,7
NN0247613	4	100,1
SSR22155	4	100,2
NN0225987	4	100,2
NN0247623	4	100,4
NN0223759	4	100,5
NN0227111	4	100,5
NN0223284	4	100,6
NN0223295	4	100,6
NN0224972	4	100,6
NN0246321	4	100,6
NN0226554	4	100,6
SSR06347	4	100,6
NN0228925	4	100,6
SSR15203	4	100,8
NN0226376	4	100,8
SSR21197	4	100,8
NN0226559	4	101,3
SSR14015	4	101,3
NN0225554	4	101,4
NN0223718	4	101,4
NN0223742	4	101,4
NN0227971	5	0,0
NN0226380	5	0,2
NN0224416	5	0,2
NN0224425	5	0,2
NN0247032	5	0,4
NN0227159	5	0,4
NN0227081	5	0,5
SSR14247	5	0,7
NN0227163	5	0,7
SSR17022	5	0,9
NN0247383	5	0,9
NN0227849	5	1,0
NN0247369	5	1,0
NN0227216	5	1,1
NN0227224	5	1,1
NN0226775	5	1,2
NN0226854	5	1,3
SSR13086	5	2,0
NN0227542	5	2,0
NN0224662	5	2,2
NN0223648	5	2,2
NN0223632	5	2,2

ES 2 804 457 T3

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0228445	5	2,3
NN0229042	5	2,3
NN0223496	5	2,5
NN0225635	5	2,5
NN0224047	5	2,6
NN0223877	5	2,6
NN0224052	5	2,7
NN0227420	5	4,3
NN0223296	5	5,1
SSR22469	5	5,1
SSR19538	5	5,9
NN0224657	5	5,9
SSR02454	5	9,6
NN0225945	5	9,6
NN0226455	5	9,6
SSR12467	5	9,6
SSR19719	5	9,6
NN0226450	5	9,6
NN0226658	5	9,9
NN0224159	5	9,9
NN0226797	5	9,9
NN0227362	5	9,9
NN0224785	5	9,9
NN0228078	5	9,9
NN0226536	5	9,9
NN0226528	5	9,9
NN0228505	5	10,0
NN0226756	5	10,0
NN0223780	5	10,0
NN0247311	5	10,2
NN0227594	5	10,2
SSR16032	5	10,2
NN0225849	5	10,2
NN0227145	5	10,2
SSR10002	5	10,3
SSR16842	5	10,3
NN0223450	5	10,3
NN0224763	5	14,2
NN0227468	5	14,6
NN0228918	5	14,6
NN0226418	5	14,6
NN0225926	5	14,6
NN0225883	5	14,6
NN0228145	5	14,7
NN0227295	5	14,7
NN0226387	5	14,7
NN0227584	5	15,0
NN0246349	5	15,1
NN0227168	5	15,8
SSR01859	5	15,8
NN0227165	5	15,8
SSR00023	5	16,1
NN0226433	5	16,1

ES 2 804 457 T3

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
SSR00398	5	16,1
NN0223950	5	16,4
SSR19998	5	16,4
NN0246612	5	17,6
NN0224029	5	17,6
SSR01610	5	17,6
SSR20648	5	17,6
NN0246303	5	17,6
SSR22172	5	17,6
NN0227653	5	17,6
NN0226303	5	17,6
NN0228175	5	17,7
SSR07369	5	17,7
NN0227913	5	18,9
SSR20208	5	18,9
NN0246687	5	18,9
NN0223949	5	18,9
NN0224861	5	18,9
NN0224841	5	18,9
NN0223182	5	19,0
SSR10795	5	19,0
NN0225294	5	20,3
NN0225315	5	20,3
NN0229134	5	21,6
NN0227380	5	21,6
NN0225199	5	21,7
NN0225904	5	21,7
NN0224426	5	21,8
NN0226415	5	22,2
NN0225222	5	22,8
SSR13639	5	22,8
NN0225428	5	22,8
NN0226841	5	22,8
SSR03341	5	24,5
SSR05819	5	24,5
SSR07559	5	24,5
NN0228879	5	24,5
NN0226553	5	25,3
NN0223140	5	25,3
NN0227540	5	25,3
NN0228457	5	25,6
NN0228069	5	26,2
SSR07057	5	26,7
NN0225531	5	26,7
SSR10348	5	26,7
SSR03950	5	28,1
SSR11167	5	28,1
NN0228895	5	28,1
NN0224856	5	29,0
NN0226092	5	29,9
NN0247223	5	30,1
NN0246356	5	30,4
NN0224773	5	31,1

ES 2 804 457 T3

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0225532	5	31,2
NN0225517	5	31,2
NN0229077	5	31,2
SSR20895	5	31,2
NN0229137	5	31,2
NN0224304	5	31,7
NN0247509	5	31,7
NN0227435	5	31,7
NN0227405	5	31,7
SSR23615	5	31,9
SSR10542	5	31,9
SSR14051	5	31,9
SSR21861	5	31,9
NN0228317	5	31,9
NN0223802	5	32,3
SSR20487	5	32,3
NN0227305	5	33,2
SSR18593	5	33,5
NN0223112	5	33,5
NN0228982	5	33,5
NN0247183	5	33,5
NN0246332	5	33,8
NN0224476	5	33,9
NN0224325	5	34,5
NN0227981	5	36,1
NN0247085	5	37,4
NN0226041	5	37,4
NN0226671	5	37,4
NN0224375	5	37,6
NN0223399	5	38,6
SSR23101	5	39,1
NN0224283	5	39,1
SSR11750	5	39,7
NN0224246	5	39,7
NN0247066	5	40,4
NN0228739	5	40,4
NN0228814	5	40,5
NN0225803	5	40,9
NN0247244	5	41,0
NN0223974	5	41,0
NN0224213	5	41,0
NN0224193	5	41,0
NN0224669	5	41,0
SSR07284	5	41,0
NN0227571	5	41,2
NN0227555	5	41,2
NN0227525	5	41,3
NN0223689	5	41,4
SSR14269	5	41,4
NN0223687	5	41,4
NN0226194	5	41,6
NN0226187	5	41,6
NN0227343	5	42,3

ES 2 804 457 T3

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0227129	5	42,3
NN0228943	5	42,3
NN0228968	5	42,3
SSR19178	5	43,0
NN0225790	5	43,0
SSR10720	5	44,8
NN0224377	5	44,8
SSR12921	5	44,8
NN0226709	5	44,8
NN0246677	5	45,2
NN0224642	5	45,2
NN0247731	5	45,2
NN0224840	5	45,2
NN0226013	5	45,6
NN0227895	5	46,1
NN0224349	5	46,1
SSR15893	5	47,8
NN0227665	5	47,8
NN0226326	5	48,9
NN0229099	5	48,9
NN0225940	5	48,9
NN0225518	5	49,0
NN0225544	5	49,1
NN0226346	5	49,2
NN0226508	5	49,2
NN0246770	5	49,3
SSR07711	5	49,4
SSR21291	5	49,4
NN0223897	5	49,4
SSR23148	5	49,4
SSR23132	5	49,4
SSR32717	5	49,4
NN0224455	5	49,4
SSR16110	5	49,4
NN0226166	5	50,0
NN0228693	5	51,7
NN0246672	5	51,7
NN0226430	5	51,7
NN0227495	5	52,3
NN0225480	5	53,2
NN0225654	5	53,2
NN0227497	5	53,2
SSR15321	5	53,3
NN0223392	5	53,3
NN0224442	5	53,7
NN0225103	5	54,3
NN0224698	5	54,3
NN0227581	5	55,5
NN0247308	5	55,6
NN0225661	5	55,9
NN0226631	5	55,9
NN0224600	5	55,9
NN0246411	5	56,1

ES 2 804 457 T3

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0223215	5	56,2
NN0226316	5	56,2
NN0228725	5	56,3
NN0246410	5	56,3
NN0223921	5	56,5
NN0229142	5	56,8
NN0226764	5	57,4
NN0224228	5	57,7
NN0224229	5	57,7
NN0224406	5	58,3
NN0225311	5	58,6
NN0229148	5	59,9
Cs28	5	60,1
NN0227759	5	60,1
NN0223336	5	60,3
SSR15818	5	60,3
NN0225562	5	60,3
NN0247548	5	60,6
NN0224461	5	60,7
NN0227603	5	60,7
NN0246604	5	60,9
NN0247389	5	60,9
NN0246347	5	61,4
NN0247348	5	61,9
NN0226809	5	62,6
NN0226762	5	62,6
NN0247445	5	62,7
NN0223334	5	67,1
NN0225936	5	68,4
NN0225451	5	68,4
NN0224327	5	68,4
NN0246449	5	68,4
NN0228465	5	68,4
NN0223507	5	68,6
SSR02244	5	68,6
NN0246335	5	69,1
SSR06660	5	69,1
NN0224251	5	69,6
SSR17464	5	69,6
NN0246571	5	69,6
NN0224832	5	71,1
SSR23706	5	71,3
SSR03529	5	71,3
SSR07184	5	71,3
NN0226931	5	71,3
NN0228305	5	71,6
NN0247786	5	71,8
SSR07100	5	71,8
NN0227082	5	71,8
SSR19172	5	71,8
NN0247485	5	71,9
NN0227153	5	72,5
SSR00772	5	72,5

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0227421	5	72,5
NN0223866	5	72,5
SSR00670	5	73,6
SSR01498	5	73,6
SSR04816	5	73,6
NN0224048	5	73,6
SSR20859	5	73,6
NN0227318	5	73,9
NN0226912	5	74,1
NN0226871	5	74,4
NN0227924	5	74,4
NN0223640	5	74,4
NN0226104	5	74,4
NN0223518	5	75,1
NN0247794	5	75,1
NN0226645	5	75,2
NN0223160	5	75,4
NN0227504	5	75,5
NN0228997	5	75,5
NN0226525	5	75,5
NN0224248	5	75,5
NN0224226	5	75,5
NN0228632	5	75,5
NN0247702	5	75,5
NN0229017	5	75,5
NN0225600	5	75,5
NN0223755	5	75,6
NN0225793	5	75,7
NN0226053	5	75,7
NN0246483	5	75,7
NN0246327	5	76,1
SSR14180	5	76,1
NN0226354	5	76,7
NN0228464	5	76,7
SSR00648	5	76,9
CSWCT17	5	76,9
SSR26904	5	76,9
NN0226186	5	76,9
NN0223789	5	77,0
NN0223809	5	77,0
NN0226623	5	77,2
NN0223634	5	77,2
NN0246814	5	77,2
NN0227194	5	77,3
NN0225426	5	77,4
NN0225876	5	77,4
NN0226156	5	77,4
NN0247406	5	77,6
NN0246437	5	77,8
NN0223864	5	77,8
NN0246426	5	77,8
SSR17975	5	77,8
NN0223659	5	77,9

ES 2 804 457 T3

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0226257	5	77,9
NN0225344	5	77,9
SSR20486	5	77,9
NN0246586	5	77,9
NN0226429	5	78,0
NN0225867	5	78,0
NN0225673	5	78,0
NN0228260	5	78,0
NN0225717	5	78,0
NN0247058	5	78,1
NN0223685	5	78,1
NN0223699	5	78,1
NN0223091	5	78,1
NN0226394	5	78,2
NN0225216	5	78,2
NN0247709	5	78,3
NN0247443	5	78,3
NN0224090	5	78,3
NN0223081	5	78,3
SSR06303	5	78,6
NN0225646	5	78,6
NN0225626	5	78,6
NN0229147	5	78,6
NN0229106	5	78,6
NN0229020	5	78,6
NN0228957	5	78,6
NN0247140	5	78,6
NN0227071	5	78,7
NN0246376	5	78,7
NN0224281	5	78,7
NN0226051	5	78,7
NN0226076	5	78,7
NN0223859	5	79,1
NN0247574	5	79,1
SSR13237	5	79,3
NN0226937	5	79,3
NN0226940	5	79,3
NN0247180	5	79,4
NN0247563	5	79,5
NN0247704	5	79,5
NN0247447	5	79,5
NN0247630	5	79,5
NN0224507	5	80,0
NN0247388	5	80,1
NN0224321	5	80,1
NN0225878	5	80,1
NN0224365	5	80,1
NN0225310	5	80,1
NN0227929	5	80,3
NN0224031	5	80,6
NN0228710	5	80,7
NN0224991	5	80,7
NN0226870	5	80,7

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma #	Posición en el mapa
NN0228616	5	80,7
NN0226516	5	80,8
NN0226453	5	81,0
NN0226540	5	81,4
NN0227287	5	81,5
NN0227228	5	81,5
SSR03514	5	81,5
SSR21219	5	81,5
NN0228055	5	81,5
NN0246331	5	81,8
NN0227097	5	81,8
NN0246889	5	81,8
NN0224713	5	81,8
NN0228255	5	81,8
NN0224443	5	81,8
NN0228289	5	81,8
NN0225431	5	81,9
NN0227769	5	82,0
NN0226910	5	82,0
NN0227655	5	82,0
SSR02895	5	82,1
SSR16143	5	82,1
NN0226391	5	82,1
SSR19343	5	82,1
NN0247172	5	82,6
NN0228132	5	82,6
NN0226532	5	82,6
NN0228148	5	82,7
SSR03758	5	82,7
NN0226082	5	82,7

Ejemplo 10: Desarrollo de la población de mapeo de QIR

5 Una población de mapeo de línea endogámica recombinante (RIL), denominada "QIR", generada a partir de un cruce inicial entre el progenitor susceptible al Moho Velloso 05VA8409 (una línea que era resistente al Moho Pulvurulento y al virus del desorden de retraso en el crecimiento amarillo del pepino, CYSDV) y un progenitor resistente al Moho Velloso derivado de PI-197088 se usó para examinar la genética de la resistencia al Moho Velloso del pepino (CDM). Las 40 líneas en la población fueron fenotipadas en las generaciones F₄ y F₅ en Saint-Andiol, Francia. Los análisis previos de mapeo de QTL con estos datos identificaron un QTL importante para la resistencia al CDM en un grupo de enlace, definido en esta población como "IV", que luego se encontró que correspondía al cromosoma 5. El mapeo fino con marcadores de CAPS sugirió dos QTL vinculados en 35,8 cM y 42,7 cM en el mapa genético generado a partir de esta población, dentro de esta región en el cromosoma 5.

15 Basado en los tres QTL en los cromosomas 2, 4 y 5, identificados para CDM usando las poblaciones de mapeo API y VJ (por ejemplo, véanse los Ejemplos 7-8) que comparten el progenitor resistente al Moho Velloso PI-197088, la generación F₆ de este cruce fue genotipada con 60 marcadores espaciados aproximadamente de manera uniforme en estos tres cromosomas, con el fin de validar estos tres QTL en la población QIR. Para cada uno de los ensayos de generación de F₄ y F₅, se plantaron 10 plantas maduras de cada familia F_n y se evaluó su resistencia a infecciones naturales de mohos vellosos (*Pseudoperonospora cubensis*) en un diseño de bloques al azar de tres repeticiones. Para el ensayo de F₄, cada familia F₄ recibió una puntuación general de la enfermedad para cada una de las tres réplicas. Para el ensayo de F₅, cada planta recibió una puntuación de enfermedad para cada una de las tres réplicas. Las puntuaciones de la enfermedad variaron de 2 (susceptibles) a 8 (resistentes). Se observó que la determinación del sexo se segregaba en las familias F₄. Para el análisis de la población de mapeo QIR, los datos fenotípicos sin procesar de los ensayos de F₄ y F₅ se ajustaron para tener en cuenta los efectos de las réplicas (y la determinación del sexo en F₄). En total, 40 familias tenían un valor fenotípico no faltante en al menos uno de los ensayos de F₄ o F₅.

Se genotiparon un total de 60 SNP en 301 muestras de F₆ correspondientes a 38 líneas únicas de F₆. Se genotiparon siete u ocho plantas de cada RIL, y se utilizaron tanto datos fenotípicos como genotípicos en este análisis. Ocho muestras del progenitor susceptible también fueron genotipadas. Los genotipos de consenso se dedujeron con base en el siguiente criterio: para cada locus, si los genotipos no eran consistentes en todas las muestras replicadas (plantas del mismo RIL), el genotipo que ocurría en más del 50% de las muestras se tomó como consenso; de lo contrario, se dio una designación de genotipo "faltante" al locus. De los 60 marcadores probados, 28 eran monomórficos (no segregantes) en la población de F₆ y fueron excluidos de un análisis posterior. La Tabla 20 proporciona un resumen de los marcadores utilizados.

Tabla 20. Resumen de marcadores; se genotiparon 32 marcadores informativos en 38 RIL F6 y se utilizaron

Crom	# total de marcadores genotipados	# de Loci segregantes	Espaciamiento promedio entre marcadores (cM)	Espaciamiento máximo entre marcadores (cM)
2	12	5	4,5	7,7
4	25	16	3,7	8,7
5	23	11	5,0	19,7
Total	60	32	4,3	19,7

Un enfoque no paramétrico basado en la prueba de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, J. Amer. Statistical Assoc. 47: 583-621, 1952) y la regresión de Haley-Knott (Haley & Knott, Heredity 69: 315- 324, 1992) se utilizó para evaluar la presencia de un QTL en cada intervalo de 1 cM. A los valores fenotípicos idénticos entre los RIL se les asignaron intervalos promedio. Las probabilidades de genotipo condicional se estimaron en base a los datos de marcadores de puntos múltiples observados usando el algoritmo Hidden Markov y la función del mapa de Kosambi. La significancia se determinó a partir de pruebas de permutación dentro de 1.000 permutaciones con $\alpha = 0,05$. Todos los análisis de mapeo de QTL se realizaron usando R/QTL (Broman et al., Bioinformatics 19: 889-890, 2003).

Ejemplo 11: Análisis de QTL para la población QIR

Se identificaron dos QTL diferentes en el Crom5: 55,5 cM y el Crom4: 70 cM para la resistencia al CDM recolectada de las poblaciones QIR F₄ y F₅ respectivamente (Figura 6 y Tabla 21). No se detectó ningún vínculo significativo con la resistencia al Moho Velloso en el Crom2 para ninguno de los conjuntos de datos de F₄ o F₅ en la población QIR. Para ambos QTL en los cromosomas 4 y 5, confirió resistencia mediante el alelo correspondiente al progenitor resistente: se estimó que cada alelo resistente reducía la puntuación de la enfermedad en ~ 0,7, lo que sugiere un efecto de 1,4 unidades de enfermedad por QTL (Tabla 21 y Figura 7)

Tabla 21. QTL para la resistencia al Moho Velloso del pepino identificada usando fenotipos de poblaciones QIR de F₄ y F₅

Generación	F4	F5
Cromosoma	5	4
Posición (cM)	55,5	69,8
LOD	3,65	2,58
Valor P (1.000 permutaciones)	0,000	0,026
% de variación explicada	36,80	25,53
Efecto aditivo	-0,76	-0,70
Efecto de dominancia	-1,25	1,09
Marcador más cercano	NN0226631	NN0246425
Distancia al marcador más cercano	0,0	2,7
Media poblacional	3,34	3,88
Media del alelo donante	4,02	4,38
Media del alelo susceptible	2,49	2,96
Intervalo de 1-LOD (cM)	45,5-62,5	56,8-82,0
Marcadores de flanqueo de 1-LOD	NN0227981-NN0247786	NN0247342-NN0224495
Intervalo de 2-LOD (cM)	41,5-77,5	31,8-82,0
Marcadores de flanqueo de 2-LOD	NN0227981-NN0227071	NN0225088-NN0224495
Intervalo de 3-LOD (cM)	28,5-78,3	25,8-82,0
Marcadores de flanqueo de 3-LOD	NN0224856-NN0227071	NN0228579-NN0224495

Debido a que estos dos QTL en los cromosomas 4 y 5 han sido identificados consistentemente en las poblaciones API, VJ y QIR, estos dos QTL parecen actuar de forma aditiva o epistática en el control genético de la resistencia al

Moho Velloso. Se probó el siguiente modelo epistático: resistencia al Moho Velloso $\sim Q1 + Q2 + Q1 \times Q2$, en el que Q1 se mapea a Crom4: 69,8 cM QTL y Q2 se mapea a Crom5: 55,5 cM QTL. Si bien se encontró que el modelo completo era significativo para los datos de F_4 y F_5 (el valor P del estadístico F fue 0,016 y 0,015 respectivamente), el examen de los submodelos reveló que solo un término del modelo era significativo ($P < 0,05$) en cada caso: solo Q2 fue significativo para el conjunto de datos de F_4 y solo Q1 fue significativo para el conjunto de datos F_5 .

De los tres QTL (Crom2: 21,8-73,8 cM, Crom4: 13,8-87,6 cM, Crom5: 22,6-81,0 cM) identificados previamente usando las poblaciones de mapeo API y VJ, dos (uno en Crom4 y uno en Crom5) fueron también identificados en la población QIR actual. Se encuentra que las dos regiones de QTL son relativamente grandes. Es decir, incluso a intervalos de 1-LOD, se predice que los dos QTL residen dentro de ~ 20 cM. No se identificó una interacción epistática significativa entre estos dos QTL, lo que sugiere que estos dos QTL pueden tener un efecto aditivo en la resistencia al Moho Velloso (Figura 8).

Ejemplo 12: Mapeo fino de QTL para la resistencia al Moho Velloso en los cromosomas 2, 4 y 5

Se realizó un mapeo fino adicional de QTL de los cromosomas 2, 4 y 5 que confieren resistencia al Moho Velloso del pepino junto con los análisis de QTL descritos anteriormente (por ejemplo, Tabla 19). El mapeo fino con los siguientes marcadores en el cromosoma 2 (con las posiciones en el mapa entre paréntesis): NNO246378 (14,554); NNO227646 (19,999); NNO223782 (22,448); NNO226279 (26,487); NNO246831 (28,802); NNO226670 (30,115); NNO224124 (32,406); NNO247070 (34,669); NNO227137 (36,613); NNO247472 (38,441); NNO227700 (55,622); y NNO247695 (66,466) indicó que el QTL de CDM en el cromosoma 2 se extiende entre las posiciones en el mapa 14,5-66,4 cM, incluyendo 14,5- 38,4 cM, con base en los resultados de la población de mapeo QIR.

El mapeo fino con los siguientes marcadores en el cromosoma 4 (con las posiciones en el mapa entre paréntesis): NNO225012 (20,649); NNO228579 (25,816); NNO226451 (27,944); NNO225088 (30,428); NNO247551 (35,460); NNO247100 (37,638); NNO224390 (44,531); NNO225551 (46,644); NNO228715 (49,546); NNO227475 (50,320); NNO227873 (50,477); NNO228883 (50,812); NNO223084 (53,747); NNO226586 (53,869); NNO247342 (54,495); NNO224702 (62,385); NNO224265 (65,543); NNO225482 (66,478); NNO225553 (66,478); NNO223940 (67,148); NNO246425 (67,148); NNO224041 (75,834); NNO224495 (81,973); NNO227587 (87,395); y NNO246631 (98,405) indicó que el QTL de CDM en el cromosoma 4 se extiende entre las posiciones en el mapa 56,8- 82,0 cM con un intervalo de 1-LOD, o entre 31,8- 82,0 cM con un intervalo de 2-LOD, o entre 25,8- 82,0 cM con un Intervalo de 3-LOD, con base en los resultados de la población de mapeo QIR.

El mapeo fino con los siguientes marcadores en el cromosoma 5 (con las posiciones de mapa entre paréntesis): NN5096749 (25,200); NNO228457 (25,235); NNO224856 (28,544); NNO246356 (30,032); NNO225532 (30,761); NNO228982 (33,131); NNO227981 (35,718); NNO223689 (41,014); NNO225790 (42,626); NNO246677 (44,758); NNO247731 (44,780); NNO226326 (48,512); NN5096750 (51,200); NN0246672 (51,326); NN0224442 (53,297); NN0226631 (55,452); NN0224600 (55,452); NN0246411 (55,649); NN0247786 (71,424); NN0223160 (74,955); NN0223809 (76,617); NN0227071 (78,303); y NN0228148 (82,273) indicó que el QTL del CDM en el cromosoma 5 se extiende entre las posiciones en el mapa 45,5- 62,5 cM con un intervalo de 1- LOD, o entre 41,5-77,5 cM con un intervalo de 2-LOD, o entre 28,5-78,3 cM con un intervalo de 3-LOD, con base en los resultados de la población de mapeo QIR.

Por lo tanto, el QTL del cromosoma 2 puede extenderse entre las posiciones en el mapa 14,5-66,4 cM, o entre 14,5- 38,4 cM. Del mismo modo, el QTL del cromosoma 4 puede extenderse desde 13,8-87,6 cM, o entre 25,8- 82,0 cM. o entre 31,8-75,8 cM. La QTL del cromosoma 5 también puede extenderse de 22,6-81,0 cM, o entre 25,2- 78,3 cM, o entre 28,5- 75,0 cM.

Ejemplo 13: Refinamiento de los intervalos de QTL para la resistencia al Moho Velloso y desarrollo de líneas de retrocruzamiento con eventos de recombinación genética a través de los QTL

Para identificar la subregión o subregiones de los intervalos de QTL previamente identificados (por ejemplo, en los cromosomas 2, 4 y/o 5) que están altamente asociados con la resistencia al DM, se identificaron regiones de introgresión de PI197088 en 61 líneas resistentes al DM desarrolladas a partir de dos clases diferentes de germoplasma. Para ambas clases de germoplasma, las líneas resistentes presentaron regiones introgresadas en las tres regiones de QTL, lo que respalda la utilidad de los QTL identificados para conferir resistencia al DM en el material de reproducción. Para cada intervalo de QTL, se observaron regiones con alelos marcadores de frecuencia relativamente alta encontrados en PI197088; es probable que estas regiones introgresadas contengan los QTL que confieren resistencia al DM, o marcadores que están altamente asociados con estos QTL. Se encontró que las regiones altamente asociadas con la resistencia al DM incluyen: QTL2: 14,554-38,4 cM; QTL4: 44,531-66,478 cM; y QTL5: 25,235-42,626 y 53,297-71,424 cM.

Una planta con resistencia al DM, en este caso, una planta de la progenie de PI197088, denominada progenitor donante (DP), se cruzó con plantas de varias líneas endogámicas de élite susceptibles al DM, denominadas progenitores recurrentes ("RP"). Las plantas de la generación F_1 de dicho cruce se retrocruzaron con plantas de cada RP para formar la generación de retrocruzamiento 1 (BC_1). En cada pedigrí de RP, 40 a 50 plantas BC_1 se

retrocruzaron con plantas RP para formar la generación BC₂. Esto ocurrió antes de la identificación inicial del QTL de DM.

5 Cuando se desarrollaron los marcadores para el QTL de resistencia al DM del cromosoma 4 ("QTL04") y el QTL de resistencia al DM del cromosoma 5 ("QTL05"), se genotipó el tejido remanente de cada planta BC₁, y se identificaron las plantas heterocigotas para los QTL. Las plantas de la progenie BC₂ a partir de las plantas BC₁ heterocigotas con QTL de DM se genotiparon con marcadores en los extremos distales de cada QTL de DM. Usando estos datos, se seleccionaron las plantas BC₂ que contenían eventos de recombinación genética dentro de uno de los QTL de DM, mientras se mostraba un alelo RP homocigoto en el otro QTL de DM. Estas plantas fueron autopolinizadas en un invernadero para crear la generación BC₂F₂. En el siguiente ciclo de cultivo, las plantas BC₂F₂ de cada pedigrí BC₂ recombinante se genotiparon con marcadores en el QTL de DM, se seleccionaron por homocigosidad del alelo favorable en la sección recombinante del QTL de DM y se autopolinizaron para crear la generación BC₂F₃. Cada familia BC₂F₃ era uniformemente homocigota para el alelo de DP en la sección recombinante de un QTL de DM y RP homocigota para el otro QTL, con el fin de conferir un fenotipo uniforme para el DM dentro de cada familia. Las familias BC₂F₃ recombinantes podrían entonces ser fenotipadas para DM con cuatro controles experimentales que consisten en líneas BC₂F₃ que habían sido seleccionadas por la presencia solamente de alelos desfavorables (RP) tanto en QTL04 como en QTL05 (control nulo); la presencia de alelo desfavorable en QTL04, el alelo favorable en QTL05; la presencia de alelo favorable en QTL04, alelo desfavorable en QTL05; la presencia del alelo favorable tanto en QTL04 como en QTL05. Los datos se pueden analizar en una serie de pruebas emparejadas entre los controles y las familias BC₂F₃. Los genotipos de las familias recombinantes BC₂F₃ que muestran resistencia al DM significativamente mejor que el control nulo se evalúan para determinar la ubicación de la región que contiene el alelo favorable en el QTL de DM. Si todas las familias BC₂F₃ que comparten este genotipo muestran una resistencia superior al DM, ese intervalo genético se define como el que contiene el QTL de DM. Mediante la comparación de múltiples familias BC₂F₃ con fragmentos recombinantes diferentes pero superpuestos, se identifica una región genética y física más pequeña que contiene el QTL de DM. Los marcadores genéticos adicionales utilizados para refinar las posiciones en el mapa de los QTL de DM se enumeran en la Tabla 22. Dichos marcadores se utilizan con diversas poblaciones de mapeo, tal como QIR, API o VJ, entre otras.

Tabla 22: Ejemplo de secuencias genómicas adicionales de ADN de *C. sativus* que flanquean los sitios de marcadores de SNP enlazados a QTL en los cromosomas 2, 4 y 5 para refinar las posiciones en el mapa de QTL

Nombre del Marcador	Cromosoma; posición en el mapa	Secuencia genómica de ADN (SEQ ID NOs: 70-87). El sitio de SNP con polimorfismo se presenta entre paréntesis
NN0246378	2; 14,554	AAATGACTTATCTAGATGGATATGATAACTTCACCCGATTGTT GGATAAAAAGCAGGTGAC[A/G]AGTTGTGTTATTATTGGG CAGTGATGTTTGTAG ⁿ TAAACCACCTGAAATTGTTAAAAATT A
NNO224041	4; 75,834	TCTTTAAAAGAAGCTTGAAGAATGAAGAAATTGCAAAATT TCAATCATTTTCGATCCCTCC[A/T]CTCACCTGAAAAAGTGGT TAATTCGATGATTTTAGATCATGGTCCATTGATCCCTCAAT ATTTTATAGATGTGAGCCCTATTTATGTGCTCTTAACTTCTCTT
NN0227587	4; 87,395	TTAGTAATGGTGGAATG[T/C]AATTTGTTTATGAGCAATGG TATCGTGAATAAATGGTTGGATACATAATAGCTTTGCTTG
NN5096749	5; 25,200	ACTAGGTCGTGGGATGTCGTGGGGGACATGTTAAATCCAT GGCTGTCTA[G/A]AAGGAAATTTCCATATCATTGAGATCTAG GTGCACA AATTCCTCGAACCTA
NN0224856	5; 28,544	GGACATTCTTACACATAAATCAGAAATGTCGTACACAACCCA AAATTCTCCAATTAGCTAA[T/C]AGCGTTACAGATCTTCTTT TCCGCTTCTTTCCACCGATGATTGATATAGGTGCCCTGAA
NN0223160	5; 74,955	AATGCAACAATTCTTTCAGCTAAGGAGAAGAAGAAGCAA AAGAAAGAAAACACTCCACC[T/C]CTAGCCATTGCCCATCA TCCATCTAAAATTTCTTACTAAGATGCATAATACTTCCACAT A
NN0223809	5; 76,617	GGAGATTGTGACGCCCTGAAGAAAGCCCTTCAGAATTACC ATTAAAGACTTCCCAACTCTG[T/C]CTGCATATTGTCAAGAAA GCTAGAGATTTTCTCAGAAAGCTACTTTAATGGCAGGGCCCT C

(continuación)

Nombre del Marcador	Cromosoma; posición en el mapa	Secuencia genómica de ADN (SEQ ID NOs: 70-87). El sitio de SNP con polimorfismo se presenta entre paréntesis
NN0226631	5; 55,452	GTCAAAAAGGTCAAAGTCCACACTCCTCAGCTTATGAATCAA AACCTGCACAGAGGAA[A/T]CACAAACAATTTCAAC TTTTCAGCTTAACTTTGGCAATCATCAGGTTAAACAGACT T
NN0227981	5; 35,718	GGATTAATTTGCAAAAACCTTAAGTCGGGGAATTAGGGCT AAAGAGGAATTAAGGTAGAA[T/G]TGATTACCCCTGAGGAT TATTGAAGGATAAATTGAGTTGTGATTGATTAGCGAAATAA CC
NN0247786	5; 71,424	TTAGGTTCCCGCTATTGCAATACCAACAAGGCATGAAGGCT TT[C/G]GCCACAAATGTGAAATCATCAACAGTTACTATGAAC AATGAATTCGCTAACAGGAAArCGT
NN0246425	4; 67,148	GAAGTAAAGTTGCCCTGCTTCTCTTTTTTTTCACTAGGAATTGCT ATTCAGACAGTTATAAGC[A/T]CAATTTCCAATGGTGTCTTTT TGTTCATTTGTTTCAATGTTGGGATTGACATCTGTCTGAA
NN0224495	4; 81,973	ACGAAATTTCTAGTTGAGTCAAGTCAGGTTGGTTGGAAAGT GTTATCAGAAATATGTCAGT[A/G]CTTGTCAACTCTCGCACTC TCTTTGAGGCTATAAAGTTAGAGAAGAGTCTCTAGGAAGG
NN0225088	4; 30,428	GAGTTCCAAAATTGAACATCTTCAATGGACAGAAAGTTT GAAGTAGCAAGACTTAAGG[T/C]TTCCACTTGGTGTTCCTTA TCTAAGTCTCGAACAAATTTGCAATTTGATTTCTTAAATATT
NN0227071	5; 78,303	AGGAAAATACCTTCCAATAGAAAACATGGTAAATGCAATA AGCATCTAGTTCAATCCAATTC[G/C]CAAGGGTAAATGGCTAGTT CAAGATGGAACTAAAACTCTCAGAGTGGTGTGTGCAATCCT G

Nombre del Marcador	Cromosoma; posición en el mapa	Secuencia genómica de ADN (SEQ ID NOs: 70-87). El sitio de SNP con polimorfismo se presenta entre paréntesis (continuación)
NN0223782	2; 22,448	TTCATACGCCGTTGCAGCTGAAAGTGGCAACCACTTACTTCC AGATCATTAIGACAATAAA[T/C]AACCAAGGCCACCTTCAT GCATAAATGGTAAGATAATAGCAAGCTCTATACCTTCTTT T
NN0228579	4; 25,816	ACTCATAATTACAGAAACTTACTCTAAACCACAAGTCCTT AACAAATATATTTCTGCTT[C/G]CGGCTCTCTTCCTATCATG AAATTTTGCAAGCTATTCAGAAAATCC
NN0247342	4; 54,495	GTACTTGTAACCAATATGAAATGTGCACATGCCCTCTTGTCC
		TAGATAATATGCACAGTTC[A/T]CCTTAAAAGCTAAGCATA AGCCACAAATCCAAGAACCAATGTAAACCAAAACAGTATGG GA
NNO247731	5; 44,780	TGAAGAAGAGCCTTTATTGCGTCACTGGAACCTCCTTAT CCATTTATCTTGAAATGGT[T/C]GGTCAATGAACACACCTTTA CCATTTATTCAATGCCATGATTGTCTTACACAGGTGTG

5 El mapeo inicial del QTL de DM usó datos de dos poblaciones F₅ denominadas como las poblaciones API y VJ. Se
 10 evaluaron las puntuaciones medias de DM de varios ensayos para familias en la población API para detectar
 15 diferencias significativas con respecto a la media de la población. Se seleccionaron familias con puntuaciones de DM
 significativamente más altas o más bajas que la media de la población. Las plantas de cada una de estas familias se
 genotiparon y seleccionaron por homocigosidad a través de QTL de DM. Las plantas seleccionadas también se
 genotiparían para que los marcadores de todo el genoma definieran, en particular, las regiones que cambiaron de
 heterocigotas en la familia F₅ a homocigotas en la planta F₅ seleccionada y la familia F₆ derivada. Estas plantas
 fueron autopolinizadas para crear familias F₆. Estas familias se fenotipan junto con controles experimentales del
 progenitor susceptible al DM de la población API, el progenitor resistente al DM de la población (PI197088) y los
 cuatro controles experimentales descritos anteriormente, que consisten en líneas BC₂F₃ que se seleccionaron por
 presencia de solo alelos desfavorables (RP) en QTL04 y QTL05 (control nulo); presencia de alelo desfavorable en
 QTL04, alelo favorable en QTL05; presencia de alelo favorable en QTL04, alelo desfavorable en QTL05; presencia
 de alelo favorable tanto en QTL04 como en QTL05. Este análisis permite una resolución mejorada de las posiciones
 genéticas de los intervalos de QTL y la detección de QTL adicionales que contribuyen a la resistencia al DM. Al
 cambiar los genotipos en QTL de DM de heterocigoto en la familia F₅ a homocigoto en la F₆ derivada, se muestran
 fenotipos de DM más uniformes, mejorando así la resolución de las asociaciones genotipo-fenotipo.

Listado de secuencias

- 20 <110> Chan, Eva
 Schetty, Nischit
 King, Joseph
 Caldwell, David
- 25 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA IDENTIFICAR PLANTAS DE PEPINO RESISTENTES
 AL MOHO VELLOSO
- 30 <130> SEMS:108WO
- <140> Desconocido
- 35 <141> 2010-10-22
- <150> 61/254.141
- <151> 2009-10-22
- 40 <160> 87
- <170> PatentIn versión 3.5
- 45 <210> 1
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
 <223> Cebador sintético
- <400> 1
 gaatagatag gctacacttt tcctcttg 29
- 55 <210> 2
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 60 <220>
 <223> Cebador sintético
- <400> 2
 gtataaaact tgagtggaatt taatgcatga a 31
- 65 <210> 3
 <211> 35

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador sintético

 <400> 3
 tgttcataa ctacagcttc atgttaaata ttact 35

 10 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 4
 20 tagtttcttt cttgctggac gaacc 25

 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 5
 30 tatgggctat gtgaaactct t 21

 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 6
 40 agcgtgacaa ctacaaaaca t 21

 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador sintético
 50
 <400> 7
 gaaataaatg gatgaagcga gga 23

 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador sintético
 60
 <400> 8
 gttcgttgat cagtgtgata ttcaat 27

 <210> 9
 <211> 21
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador sintético

 <400> 9
 atcggcttt gccaccttt g 21

 10 <210> 10
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 10
 20 agggaggaca gagagaatt gatataat 28

 <210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 11
 30 tccgttttag gtgattgtca aatacat 27

 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 12
 40 tgtttgaag ggtttctgg g 21

 <210> 13
 <211> 18
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 13
 50 tgccatgtcg ccaacagt 18

 <210> 14
 <211> 23
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 14
 60 tcaagccata gtctaacca tgc 23

 <210> 15
 <211> 25
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador sintético

 <400> 15
 cgctatatca tggatggcta gaaat 25

 10 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 16
 20 aaagtgata gtcgatgagt tggtaaata 30

 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 17
 30 tccgcttatg ggttttgtg ag 22

 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 18
 40 tatgggctat gtgaaactct t 21

 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 50
 <400> 19
 agcgtgacaa ctacaaaaca t 21

 <210> 20
 <211> 121
 <212> ADN
 55 <213> Cucumis sativus

 <220>
 60 <221> característica miscelánea

 <222> (61)..(61)
 <223> y es c o t
 65
 <400> 20

ES 2 804 457 T3

	ttcatacgcc gttgcagctg aaagtggcaa ccattacttc cagatcatta tgacaataaa	60
	yaaccaaggc caccttcatg cataaatggt aagataatag caagctctat accttctttt	120
	t	121
5	<210> 21 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y es c o t	
15	<400> 21	
	tcttgatcaa tccaactggg ttggaactca aattcaagaa atggggttta atcacaacca	60
	ygttcaatct caattttcag attccgccat cccccccact ccctatactc aacctcctga	120
	c	121
20	<210> 22 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
25	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> m es a o c	
30	<400> 22	
	ggtttagatg aaaagaagta tgcattcatg cttttgcaca aaggcattcc tggctttcaa	60
	mtagctgtat ctcttgcagg gatataaatg gatgcaacac tcttttcagt gaaagaaatc	120
	c	121
35	<210> 23 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
40	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y es c o t	
45	<400> 23	
	ggatcattat ttatccaacg tattagcaag ctctaataga aacacttcct aaagaacata	60
	ycgatccaaa ttatatgcta agagaattac ccaacatttg agcaagtta ctgactacag	120
	c	121

ES 2 804 457 T3

<210> 24
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Cucumis sativus
 5

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (61)..(61)
 <223> r e s a o g
 10

<400> 24

tagaaaacaa gaatggttct caaagaacct accgaccgaa ttggttgagg atgagatgac 60
 raatagaaac attaataata tgggtggagga ggagggcgcgc gatgaaccgt cgcaaagcat 120
 15 t 121

<210> 25
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Cucumis sativus
 20

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (61)..(61)
 <223> r e s a o g
 25

<400> 25

ccacgaatgg aatcaatgaa ttcacgagca acctataata agagagtgga aaacaaaact 60
 rctccttcac catctaagaa aacaatgtat aaaaatcaga gaaggaaaga taaaagatac 120
 30 t 121

<210> 26
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Cucumis sativus
 35

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (61)..(61)
 <223> r e s a o g
 40

<400> 26

gaagaagagt gcaacaagta agagtctggc tgggggagtt gaagttcatt catggattag 60
 rttaacatac gaactttgga ggcgtgcaaa agacaatccc cataacttga ttacgggctt 120
 45 c 121

<210> 27
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Cucumis sativus
 50

<220>
 <221> característica miscelánea

ES 2 804 457 T3

	<222> (61)..(61)		
	<223> y e s c o t		
	<400> 27		
5			
	aaaatatatg atcctacaac taaataagag tgcacatgaa gataccttat atataggaga	60	
	yaatgatgtc gtatgtcctg cttgatgatt tcgaagaacc agatgactga agaaggaata	120	
	a	121	
10	<210> 28		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
15	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> y e s c o t		
	<400> 28		
20			
	ggagttaatc gaaggaagaa aatcaactcg tcttaacagc atcacaataa tcaaattctt	60	
	yaggtatacc tttcttctcc ttgtcactgg actcatcagg atcctcatcg gcgattttgc	120	
	g	121	
25	<210> 29		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
30	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> y e s c o t		
	<400> 29		
35			
	ctctgaagaa ttaccgaag gggtcggaat tttctctata gcctgcaatg agaggaataa	60	
	ygaggaatga aatgtttggc tctgtagcac atgaatgaaa tgcggatatt ctgccaagg	120	
	c	121	
40	<210> 30		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
45	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> y e s c o t		
	<400> 30		
50			
	agaacaacc ccaacgtccc aaaatcacta catctccaac cctttcttct cctcatcatt	60	
	yagttttagt ctctgttttg tggaactctc aatgaaatt gcttgaatac tcttgataaa	120	

	a		121
5	<210> 31 <211> 116 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y es c o t		
15	<400> 31		
	accaaaaatg aaataaaatc aggctccacc ttcaccttgc agtaatatga tggcagtagc		60
	ytgcattgta aacctggtta atagaagaaa agaactgtga gaaaatacta gaattc		116
20	<210> 32 <211> 89 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
25	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> s es c o g		
30	<400> 32		
	cggatgagga tttcaggtgt tttttctaaa caaatgtttg ccctttaaac atgcgtttgc		60
	sgattctggt ttatttgttt tcggttgat		89
35	<210> 33 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
40	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> r es a o g		
45	<400> 33		
	actatcctaa tactacggaa ttggtgtgga gaacagaaca gttatttggg ttgttcgaaa		60
	rtctcgacaa ctttcgatcg atcactcttg ttagggggta tcccaactac atcataagca		120
	a		121
50	<210> 34 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
55	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> r es a o g		
	<400> 34		

ES 2 804 457 T3

	actatcctaa tactacggaa ttggtgtgga gaacagaaca gttatttggg ttgttcgaaa	60
	rtctcgacaa ctttcgatcg atcactcttg ttagggggta tcccaactac atcataagca	120
	a	121
5	<210> 35 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y e s c o t	
15	<400> 35	
	tgcttcttga tcttgctaata gtaaagagat atcaacttaca tgaaggtt tccgagtcac	60
	ygtcaatttc tgcactggga ggcttttggg cattgctctt gaataccaca ttcccatatt	120
	t	121
20	<210> 36 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
25	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y e s c o t	
30	<400> 36	
	gagtttccaa aattgaacat cttcaatgga cagaaagttt tgaagtagca agacttaagg	60
	yttccacttg gtgttcctta tctaagttct cgaacaattt gcatttgatt tcttaaatat	120
	t	121
35	<210> 37 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
40	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> w e s a o t	
45	<400> 37	
	taatagttac atgatgcttt attgctacta tatatgttca gaaatattat ccagatgcga	60
	watattttca gacactgctg tgaatgttat ttggactaac gaaacttggt attttgtgct	120
50	g	121

ES 2 804 457 T3

5	<210> 38 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (13)..(13) <223> n es a, t, c, o g		
15	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> r es a o g		
	<400> 38		
	g	ggttacatga aantatgcac acacccaaag atatgttgat taagatgata agttcccaag	60
		ratagaagaa ttatgtgtgt attgcttctt tgatgtccag gaactaatga gatttatctg	120
20			121
25	<210> 39 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
30	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y es c o t		
35	<220> <221> característica miscelánea <222> (101)..(101) <223> n es a, t, c, o g		
40	<400> 39		
		tatagccgag caaccgagtc cttagatttg gtttaagagc atctacgaat agatggtcga	60
		ytgtatgaat gatgagcaga aacgctcttg aaacggcttc ntcacatttg aactccatgc	120
45			121
50	<210> 40 <211> 103 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
55	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> r es a o g		
	<220> <221> característica miscelánea <222> (94)..(103) <223> n es a, c, g, o t		
	<400> 40		

ES 2 804 457 T3

	tgatttatct catggagaat accaatgtgc aaaagaaacc aaagcggtc ttcttcatct	60
	rtgttttagct togatattgt gtgtagcact gcannnnnnn nnn	103
5	<210> 41 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y es c o t	
15	<400> 41	
	agaaatTTTT taagacaata cttgatatcc tttcacaat tcagttcatt cctcctataa	60
	ytgtgattcc agcaacgatt aggaatgatt tctcaattcc caccttgggtg cacatttcaa	120
	g	121
20	<210> 42 <211> 113 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
25	<220> <221> característica miscelánea <222> (53)..(53) <223> w es a o t	
30	<400> 42	
	ctttatTTTta ttttcaggtt gctcttaaTt ttgagcacag aaatagTtaa gGwtgcaatt	60
	atGgtcctcc atacgaatGg caagttTaca agtgagTaac tttttgggtt aca	113
35	<210> 43 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
40	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> w es a o t	
45	<400> 43	
	gtacttGtac caatatGaaa tgtGcacatg cgctcttGtc ctagataata tGcacagttc	60
	wcctTaaaag ctAagcataa gccacaaatc caagaaccaa tGtaaccaa acagtatggg	120
	a	121
50	<210> 44 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	

ES 2 804 457 T3

	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> w e s a o t		
5			
	<400> 44		
		ctgttgcccta tgcaaagcat ttatacagct tcattctgcc attttaacga atgttctactg	60
		wagtacctga gatggcttcc aaaactgtct tgtaagggtg gcctctcatc tgcactctgc	120
10		t	121
	<210> 45		
	<211> 116		
	<212> ADN		
15	<213> Cucumis sativus		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> m e s a o c		
20			
	<400> 45		
		tctttttata cttttctgat cttgtaaagt ttaaggcttt caactggtgt agtgtagtca	60
		mcagaagtct ttttataatt gttacacttt aatttgatag gaaagtgttt ctttaa	116
25			
	<210> 46		
	<211> 121		
	<212> ADN		
30	<213> Cucumis sativus		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> s e s c o g		
35			
	<400> 46		
		gctagtatat ctatatatct ttttgagagc tttatgataa ttatcaaatg aagattctag	60
		stgtgtgatc aagagaagat tcctagccta cctcttagct cttttaaaaa ttgtggtagt	120
40		t	121
	<210> 47		
	<211> 121		
	<212> ADN		
45	<213> Cucumis sativus		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (4)..(4)		
	<223> n e s a , c , t , o g		
50			
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (20)..(20)		
55	<223> n e s a , c , t , o g		

ES 2 804 457 T3

5	<p><220> <221> característica miscelánea <222> (24)..(24) <223> n es a, c, t, o g</p>	
10	<p><220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> k es g o t</p> <p><400> 47</p>	
	<p>taantttggtt ttcacatttn tttncaaata atatatatct tacagtttag gaggcttctt</p>	60
	<p>kcaccattac atataaaaca tatggaacaa acattacctc taaataacca atagactttt</p>	120
	<p>a</p>	121
15	<p><210> 48 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus</p>	
20	<p><220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> w es a o t</p>	
25	<p><400> 48</p>	
	<p>tctttaaaag aagcttgaaa gatgaagaaa ttgcaaaatt tcaatcattt cgatccctcc</p>	60
	<p>wctcacctga aaaagtggtt aattctgatg attttagatc atggtccatt gatccctcaa</p>	120
	<p>t</p>	121
30	<p><210> 49 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus</p>	
35	<p><220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> k es g o t</p>	
40	<p><400> 49</p>	
	<p>gtccatacta ccataattga taataactaag taccctgaac ctttgagatt tgaatctttc</p>	60
	<p>kaccccacag gttgttaaac acaaatacga gtaacaaaga taagatttga actcagcctt</p>	120
	<p>t</p>	121
45	<p><210> 50 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus</p>	
50	<p><220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> r es a o g</p>	

ES 2 804 457 T3

	<400> 50		
		ttggttcctg atccagaaga aaaatggttg atttccttat gattcttttc agtaaggtgg	60
		racaatcttg ctccaggtcc ttcgtcataa aacaccccc tccaaggaag agaaaccca	120
		a	121
5			
	<210> 51		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
10			
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> y es c o t		
15			
	<400> 51		
		atTTTTtagat gtgagcctat ttatgtgctc ttaacttctc ttttagtaat ggtggaaatg	60
		yaatttgttt atgagcaatg gtatcgtgaa taaatggttg gatacataat agctttgctt	120
20			
		g	121
	<210> 52		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
25			
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> r es a o g		
30			
	<400> 52		
		gttgggcttt tttgttgat tatttctttt tgcgtatta tgtatctaaa ggcagatgaa	60
		racctggatc atattctttg gcaatgtgat tttgcgttg tgtttgggat tcctttttcc	120
35			
		a	121
	<210> 53		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
40			
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (20)..(20)		
	<223> n es a, t, c, o g		
45			
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> r es a o g		
50			
	<400> 53		

ES 2 804 457 T3

	ttaaacaatt gacccaaaan ttaaagttga tgggtaaagg taaaactaac attatatcac	60
	rcaacattcc ctcatttgta gacttgaaat atgtagaaaa gcccattagt gaaaatgaat	120
	a	121
5	<210> 54 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (55)..(55) <223> n es a, c, g, o t	
15	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> r es a o g	
20	<400> 54	
	tattttggtg ctaaccgaat agtttgagag ggagaaatag gaaacgatga caacnccatg	60
	rattggggga agtgttcgac atttgaaaag gagaataaat caattaaaat tatgcattca	120
	a	121
25	<210> 55 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
30	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> w es a o t	
35	<400> 55	
	acacagtatt gataatttcc aatcaacac ttggaatatt tttgttaaat atgcacgaca	60
	watttggttc gttattggtc catgatggta atctatactt catatgaaat tcttatctct	120
	a	121
40	<210> 56 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
45	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y es c o t	
50	<400> 56	
	tatatgttgc taatgtgcta tttttaaaga aaaaataaag gcccatttg gtcatggttt	60
	yctctcaatt gttcaattgt actttocaca ttatttgaat aagcaatcca acttttacct	120
	a	121

ES 2 804 457 T3

5	<210> 57 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y es c o t		
	<400> 57		
	tgaagaagag cctttattgc gtcacotgga acctccttta tccatttatc ttgaattggt	60	
	yggtcatgaa cacaccttta ccatttatta ttcaatgccca tgattgtcctt acacaggtgt	120	
15	g		121
20	<210> 58 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
25	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> s es c o g		
	<400> 58		
	agtcgagttt tgagccactc ataaccagc tgaatgcttt taaccttgta gtcactaaca	60	
	saaacacagc ggaatggtag ttgaagtagg gtcattttgg ctaattcatt gcatgttggt	120	
30	a		121
35	<210> 59 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
40	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y es c o t		
	<400> 59		
	tgtccaaaag aatatatgc tcaaactgtg cctcaatcac cgtcttctct ccaattttcc	60	
	yatatcattc tcgattatta ctttcctcta tttcatttag tttctaataa ttaataacgg	120	
45	c		121
50	<210> 60 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
	<220> <221> característica miscelánea		

ES 2 804 457 T3

	<222> (61)..(61)		
	<223> r e s a o g		
5	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (104)..(104)		
	<223> n e s a, c, g, o t		
10	<400> 60		
	ccgaggcgac ctccggcttg cccgttacaa gttgggagtt gggccttggg ctctcgacgt	60	
	rggccgagag tccattgctc ctaaagattg gtgggcaccg cgtnaggctg gttcacagag	120	
	c	121	
15	<210> 61		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
20	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> s e s c o g		
25	<400> 61		
	cttctagcca aaataattcc atttttgttt cacaaaatga acctgttggg ggggaagacca	60	
	stgcgctacc catcccaaat tcagattctg gaaatatggc caagatcat tcattgaggt	120	
	c	121	
30	<210> 62		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
35	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (29)..(29)		
	<223> n e s a, c, g, o t		
40	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> y e s c o t		
45	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (110)..(113)		
	<223> n e s a, c, t, o g		
50	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (121)..(121)		
	<223> n e s a, c, t, o g		
55	<400> 62		

ES 2 804 457 T3

	atggagctta gagaaaacga cctagaaant attatcctta ttcattgtcga acgggctgtc	60
	yygtaagatt agttgaggtg cgcataatac ctggacactc acaaatatgn nnnaaaaaaaa	120
	n	121
5	<210> 63 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> s e s c o g	
15	<400> 63	
	atatggaata tttgacaact aattagttac ttctaaaact gcaatagcag tcacgtagt	60
	stccccagg gagagaagaa aatactagaa tttgtgagcc actgttaata gattcaaaat	120
	a	121
20	<210> 64 <211> 104 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
25	<220> <221> característica miscelánea <222> (44)..(44) <223> s e s c o g	
30	<220> <221> característica miscelánea <222> (101)..(101) <223> n e s a , t , c , o g	
35	<400> 64	
	ttaggttccc gctattgcaa taccaacaag gcatgaaggc tttsgccaca atgtgaaatc	60
	atcaacagtt actatgaaca atgaattcgc taacaggaaa ncgt	104
40	<210> 65 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
45	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> r e s a o g	
50	<400> 65	
	tctaattcga tgagtttgtc tgaattccca agtaagaacc aaagttccat tcattctctc	60
	ragcacaac ctttccacca aacataaca cctaaatctc ttccacatto ctttccctt	120
	a	121

ES 2 804 457 T3

<210> 66
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Cucumis sativus
 5
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (61)..(61)
 <223> y e s c o t
 10
 <400> 66

 ggagattggt gcacgcctga agaaagcctt cagaattacc attaagactt cccaactctg 60
 yctgcatatt gtcaagaaag ctagagattt tctcagaagc tactttaatg gcagggcctt 120
 c 121
 15
 <210> 67
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Cucumis sativus
 20
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (61)..(61)
 <223> s e s c o g
 25
 <400> 67

 aggaaaatac cttccaatag aaaacatggt aatgcaata agcatctagt tcatccaatt 60
 scaagggtaa tggctagttc aagatggaac taaaactctc agagtgggtg gtgcaatcct 120
 g 121
 30
 <210> 68
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Cucumis sativus
 35
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (61)..(61)
 <223> r e s a o g
 40
 <400> 68

 ggttacagag tccagagcga tcaatggaga ttgtggatgt tgaaggttca gaagagaagg 60
 rtcgttgatt aaggaggtct tcattctcca ggtgctgaac gacagtacct tccggaatct 120
 g 121
 45
 <210> 69
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Cucumis sativus
 50
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (61)..(61)
 <223> y e s c o t

ES 2 804 457 T3

	<400> 69		
	atgatcctca attcatacca tattattgta tgagctaaat gtgtataaag aaaaggaaag	60	
	ytatagaagg atggattcgt acattaacac aaaggataaa aactgcaaac ttatttatat	120	
	a	121	
5	<210> 70 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> r e s a o g		
15	<220> <221> característica miscelánea <222> (97)..(97) <223> n e s a , c , g , o t		
20	<400> 70		
	aatgacttat ctagatggat atgataactt caccgattgt tggataaaaa agcaggtgac	60	
	ragttgtgtt attattgggc agtgatgtat tgttagntaa cactgaaat tgttaaaatt	120	
	a	121	
25	<210> 71 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
30	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> w e s a o t		
35	<400> 71		
	tctttaaag aagcttgaaa gatgaagaaa ttgcaaaatt tcaatcattt cgatccctcc	60	
	wctcacctga aaaagtgggtt aattctgatg attttagatc atgggccatt gatccctcaa	120	
	t	121	
40	<210> 72 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus		
45	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y e s t o c		
50	<400> 72		

ES 2 804 457 T3

	atttttagat gtgagcctat ttatgtgctc ttaacttctc ttttagtaat ggtggaaatg	60
	yaatttgttt atgagcaatg gtatcgtgaa taaatggttg gatacataat agctttgctt	120
	g	121
5	<210> 73 <211> 101 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (51)..(51) <223> r e s g o a	
	<400> 73	
15	actaggtcgt gggatgtcgt tgggggacat gttaaatacca tggctgtcta raaggaattt	60
	ccatatcatt gagatctagg tgcacaaatt cctcgaacct a	101
20	<210> 74 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
25	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y e s t o c	
	<400> 74	
30	ggacattctt cacataaatc agaattgtcg tacacaaccc aaaattctcc aattagctaa	60
	yagcgttaca gatcttcttt tccgcttctt tccacgatgt attgatatag tgtgcctga	120
	a	121
35	<210> 75 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
40	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y e s t o c	
	<400> 75	
45	aatgcaacaa ttctttcagc taaggagaag aaagaagcaa aagaaagaaa aactccacc	60
	yctagccatt gccatcatc catctaaatt tcttactaag atgcataata tcttccacat	120
	a	121
50	<210> 76 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	

ES 2 804 457 T3

	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> y e s t o c		
5	<400> 76		
	ggagattggt gcacgcctga agaaagcctt cagaattacc attaagactt cccaactctg	60	
	yctgcatatt gtcaagaaag ctagagattt tctcagaagc tactttaatg gcagggccct	120	
	c	121	
10	<210> 77		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
15	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> w e s a o t		
20	<400> 77		
	gtcaaaaagg tcaagtcac actcctcagc ttatgaatca aaacctgca cagaagggaa	60	
	wcacaacaac attttcaact tttcagctta acttttgga atcatcaggt taaacagact	120	
	t	121	
25	<210> 78		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
30	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> k e s g o t		
35	<400> 78		
	ggattaattt gcaaaaacct taagtcgggg aattagggct aaagaggaat taaggtagaa	60	
	ktgattaccc ctgaggatta ttgaaggata aattgagttg tgattgatta gcgaaataac	120	
	c	121	
40	<210> 79		
	<211> 104		
	<212> ADN		
	<213> Cucumis sativus		
45	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (44)..(44)		
	<223> s e s g o c		
50	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (101)..(101)		
	<223> n e s a , c , g , o t		
55			

ES 2 804 457 T3

	<400> 79		
		ttaggttccc gctattgcaa taccaacaag gcatgaaggc tttsgccaca atgtgaaatc	60
5		atcaacagtt actatgaaca atgaattcgc taacaggaaa ncgt	104
	<210> 80		
	<211> 121		
	<212> ADN		
10	<213> Cucumis sativus		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> w es a o t		
15	<400> 80		
		gaagtaagtt gcctgcttct ctttttttca ctaggaattg ctattcagac agttatatgc	60
		wcatttccaa tgggtgctttt ttgttcattg ttttcaatgt tgggattgac atctgtctga	120
20		a	121
	<210> 81		
	<211> 121		
	<212> ADN		
25	<213> Cucumis sativus		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> r es g o a		
30	<400> 81		
		acgaattttc tagttgagtc aagtcagggtt gggttgaaag tgttatcaga atatgtcagt	60
		rcttgtcaac tctcgcactc tcttttgagg ctataaagtt agagaagagt ctctaggaag	120
35		g	121
	<210> 82		
	<211> 121		
	<212> ADN		
40	<213> Cucumis sativus		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (61)..(61)		
	<223> y es t o c		
45	<400> 82		
		gagtttccaa aattgaacat cttcaatgga cagaaagttt tgaagtagca agacttaagg	60
		yttccacttg gtgttcctta tctaagttct cgaacaattt gcatttgatt tcttaaatat	120
50		t	121
	<210> 83		
	<211> 121		

ES 2 804 457 T3

	gtacttgtac caatatgaaa tgtgcacatg cgctcttgtc ctagataata tgcacagttc	60
	wccttaaaag ctaagcataa gccacaaatc caagaaccaa tgtaaccaa acagtatggg	120
	a	121
5	<210> 87 <211> 121 <212> ADN <213> Cucumis sativus	
10	<220> <221> característica miscelánea <222> (61)..(61) <223> y e s t o c	
15	<400> 87	
	tgaagaagag cctttattgc gtcacatgga acctccttta tccatttata ttgaattggg	60
	yggatcatgaa cacaccttta ccatttatta ttcaatgcca tgattgtctt acacaggtgt	120
	g	121

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de obtención de germoplasma de pepino que comprende las etapas de:

- 5 a) analizar plantas de pepino para detectar la presencia de al menos un primer marcador genético genéticamente enlazado a un QTL que confiere resistencia al Moho Velloso; y
- b) seleccionar al menos una primera planta de pepino que comprenda el marcador genético y el QTL que
- 10 confiere resistencia al Moho Velloso;

en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0223689 y el marcador de SNP NN0228148 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 56 y 69, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 41,0 cM y 82,3 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino; en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0225012 y el marcador de SNP NN0227587 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 33 y 51, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 20,6 cM y 87,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0223782 y el marcador de SNP NN0226638 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 20 y 32, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 22,5 cM y 88,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 2 del pepino; o el mapa de marcadores genéticos dentro de 1 cM de dicho QTL que confiere resistencia al Moho Velloso.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247731 y el marcador de SNP NN0226631 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 57 y 77, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 44,8 cM y 55,5 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247731 y el marcador de SNP NN0247786 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 57 y 79, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 44,8 cM y 71,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0228579 y el marcador de SNP NN0224495 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 85 y 81, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 25,8 cM y 82,0 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino; en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0225088 y el marcador de SNP NN0224041 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 82 y 71, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 30,4 cM y 75,8 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247342 y el marcador de SNP NN0224495 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 43 y 81, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 54,5 cM y 82,0 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0223782 y el marcador de SNP NN0246472 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 20 y 24, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 22,5 cM y 38,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 2 del pepino.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el alelo que confiere resistencia al Moho Velloso se deriva de la línea de pepino PI197088, o una planta de la progenie de la misma.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que seleccionar la primera planta de pepino comprende además seleccionar la planta con base en la presencia de una pluralidad de marcadores genéticos que se mapean a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0223689 y el marcador de SNP NN0228148 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 56 y 69, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 41,0 cM y 82,3 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247731 y el marcador de SNP NN0226631 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 57 y 77, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 44,8 cM y 55,5 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247731 y el marcador de SNP NN0247786 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 57 y 79, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 44,8 cM y 71,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 5 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0225012 y el marcador de SNP NN0227587 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 33 y 51, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 20,6 cM y 87,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0247342 y el marcador de SNP NN0224495 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 43 y 81, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 54,5

cM y 82,0 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 4 del pepino; o en el que el QTL se mapea a una posición entre la secuencia representada por el marcador de SNP NN0223782 y el marcador de SNP NN0226638 **caracterizado por** las SEQ ID NOs: 20 y 32, respectivamente, que se mapean a aproximadamente 22,5 cM y 88,4 cM en el mapa genético del grupo de enlace denominado cromosoma 2 del pepino.

- 5
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ensayo de las plantas de pepino comprende PCR, análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla, electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante, análisis de polimorfismo de longitud del fragmento de escisión, ensayo TAQMAN y/o secuenciación de ADN.
- 10
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el marcador genético es NN0226631 o NN0246425 **caracterizado por** las SEQ ID NO: 77 y 80, respectivamente.
- 15
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el marcador genético se selecciona de los siguientes marcadores que comprenden un polimorfismo de un solo nucleótido de una de las SEQ ID NOs: 20-87: NN0223782 (SEQ ID NO: 20), NN0225385 (SEQ ID NO: 21), NN0226670 (SEQ ID NO: 22), NN0224124 (SEQ ID NO: 23), NN0246472 (SEQ ID NO: 24), NN0225358 (SEQ ID NO: 25), NN0227700 (SEQ ID NO: 26), NN0224617 (SEQ ID NO: 27), NN0247695 (SEQ ID NO: 28), NN0227242 (SEQ ID NO: 29), NN0223824 (SEQ ID NO: 30), NN0223181 (SEQ ID NO: 31), NN0226638 (SEQ ID NO: 32), NN0225012 (SEQ ID NO: 33), NN0228579 (SEQ ID NO: 34), NN0226451 (SEQ ID NO: 35), NN0225088 (SEQ ID NO: 36), NN0226219 (SEQ ID NO: 37), NN0247551 (SEQ ID NO: 38), NN0246357 (SEQ ID NO: 39), NN0225551 (SEQ ID NO: 40), NN0226732 (SEQ ID NO: 41), NN0247689 (SEQ ID NO: 42), NN0247342 (SEQ ID NO: 43), NN0224702 (SEQ ID NO: 44), NN0225482 (SEQ ID NO: 45), NN0224538 (SEQ ID NO: 46), NN0247543 (SEQ ID NO: 47), NN0224041 (SEQ ID NO: 48), NN0228853 (SEQ ID NO: 49), NN0227762 (SEQ ID NO: 50), NN0227587 (SEQ ID NO: 51), NN02 23689 (SEQ ID NO: 56), NN0247731 (SEQ ID NO: 57), NN0226166 (SEQ ID NO: 58), NN0225480 (SEQ ID NO: 59), NN0246411 (SEQ ID NO: 60), NN0227759 (SEQ ID NO: 61), NN0247348 (SEQ ID NO: 62), NN0228465 (SEQ ID NO: 63), NN0247786 (SEQ ID NO: 64), NN0226645 (SEQ ID NO: 65), NN0223809 (SEQ ID NO: 66), NN0227071 (SEQ ID NO: 67), NN0226870 (SEQ ID NO: 68), NN0228148 (SEQ ID NO: 69), NN0246378 (SEQ ID NO: 70), NN0223160 (SEQ ID NO: 75), NN0226631 (SEQ ID NO: 77), NN0246425 (SEQ ID NO: 80) y NN0224495 (SEQ ID NO: 81).
- 20
- 25
- 30
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el marcador genético se selecciona de los siguientes marcadores: NN0223782 (SEQ ID NO: 20), NN0225385 (SEQ ID NO: 21), NN0226670 (SEQ ID NO: 22), NN0224124 (SEQ ID NO: 23), NN0246472 (SEQ ID NO: 24), NN0225358 (SEQ ID NO: 25), NN0227700 (SEQ ID NO: 26), NN0224617 (SEQ ID NO: 27), NN0247695 (SEQ ID NO: 28), NN0227242 (SEQ ID NO: 29), NN0223824 (SEQ ID NO: 30), NN0223181 (SEQ ID NO: 31), NN0226638 (SEQ ID NO: 32) y NN0246378 (SEQ ID NO: 70).
- 35
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el marcador genético se selecciona de los siguientes marcadores: NN0225012 (SEQ ID NO: 33), NN0228579 (SEQ ID NO: 34), NN0226451 (SEQ ID NO: 35), NN0225088 (SEQ ID NO: 36), NN0226219 (SEQ ID NO: 37), NN0247551 (SEQ ID NO: 38), NN0246357 (SEQ ID NO: 39), NN0225551 (SEQ ID NO: 40), NN0226732 (SEQ ID NO: 41), NN0247689 (SEQ ID NO: 42), NN0247342 (SEQ ID NO: 43), NN0224702 (SEQ ID NO: 44), NN0225482 (SEQ ID NO: 45), NN0224538 (SEQ ID NO: 46), NN0247543 (SEQ ID NO: 47), NN0224041 (SEQ ID NO: 48), NN0228853 (SEQ ID NO: 49), NN0227762 (SEQ ID NO: 50), NN0227587 (SEQ ID NO: 51), NN0246425 (SEQ ID NO: 80), y NN0224495 (SEQ ID NO: 81).
- 40
- 45
12. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el marcador genético se selecciona de los siguientes marcadores: NN0223689 (SEQ ID NO: 56), NN0247731 (SEQ ID NO: 57), NN0226166 (SEQ ID NO: 58), NN0225480 (SEQ ID NO: 59), NN0246411 (SEQ ID NO: 60), NN0227759 (SEQ ID NO: 61), NN0247348 (SEQ ID NO: 62), NN0228465 (SEQ ID NO: 63), NN0247786 (SEQ ID NO: 64), NN0226645 (SEQ ID NO: 65), NN0223809 (SEQ ID NO: 66), NN0227071 (SEQ ID NO: 67), NN0226870 (SEQ ID NO: 68), NN0228148 (SEQ ID NO: 69), NN0223160 (SEQ ID NO: 75), y NN0226631 (SEQ ID NO: 77).
- 50
13. Una sonda o cebador de ácido nucleico aislado que se hibrida en condiciones de 5 X SSC, formamida al 50% y 42 °C con una región genómica de la planta de pepino que se mapea dentro de 40 cM de un QTL que confiere resistencia al Moho Velloso y comprende una secuencia que se mapea a los cromosomas 2, 4 o 5 del pepino, en la que la sonda o cebador consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 20-51, 56-72, 75-77 y 79-87.
- 55

FIG. 1

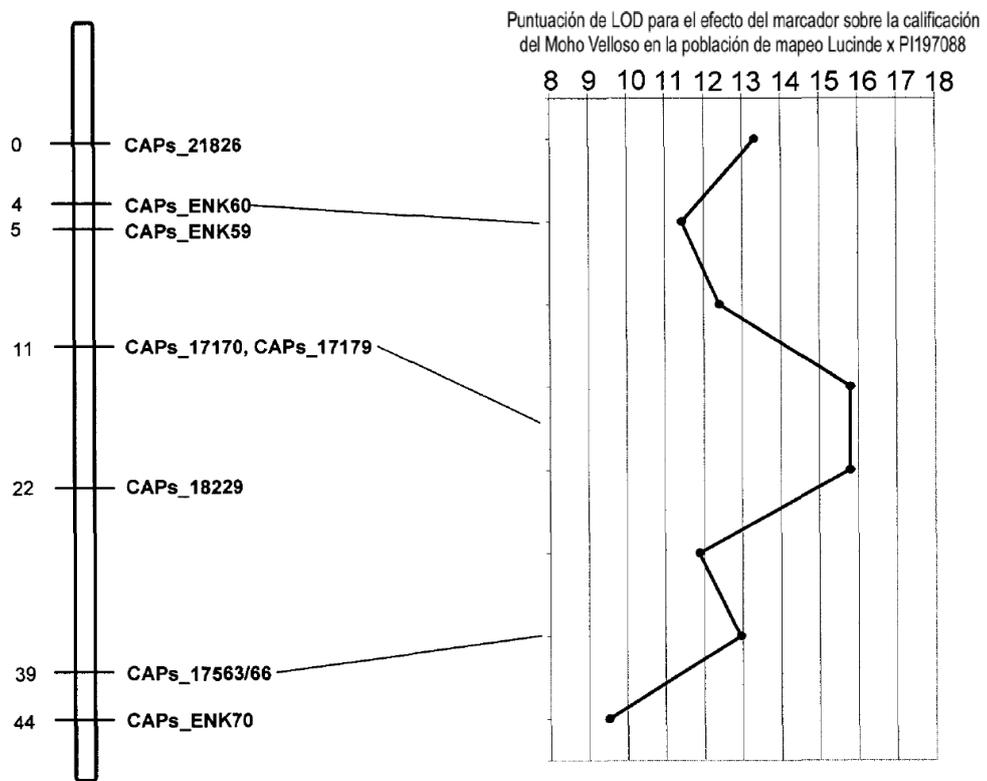


FIG. 2

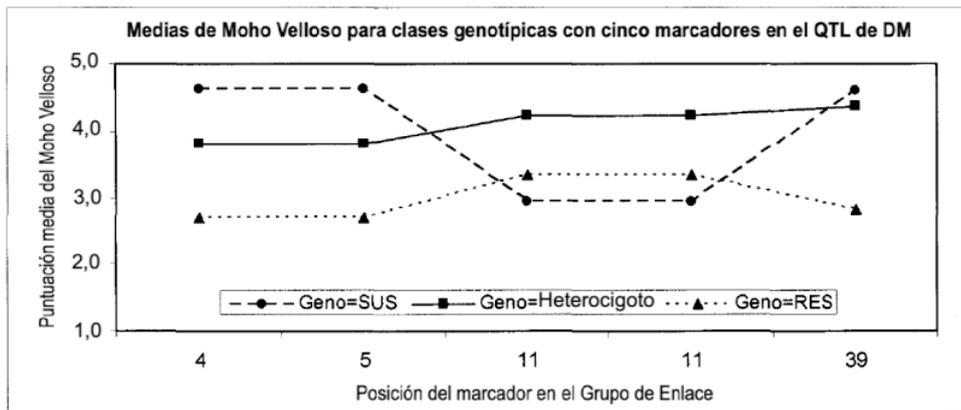


FIG. 3

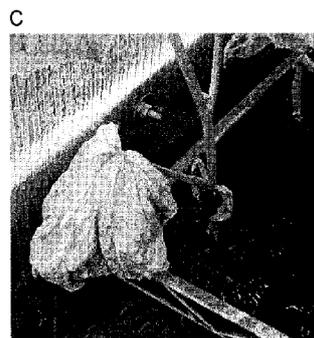
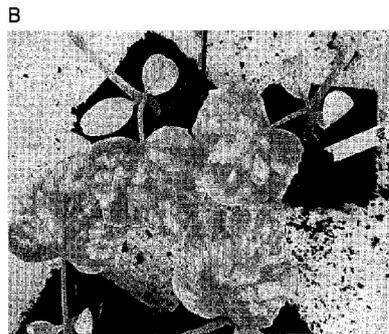
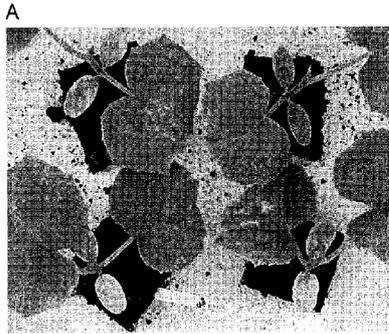


FIG. 4

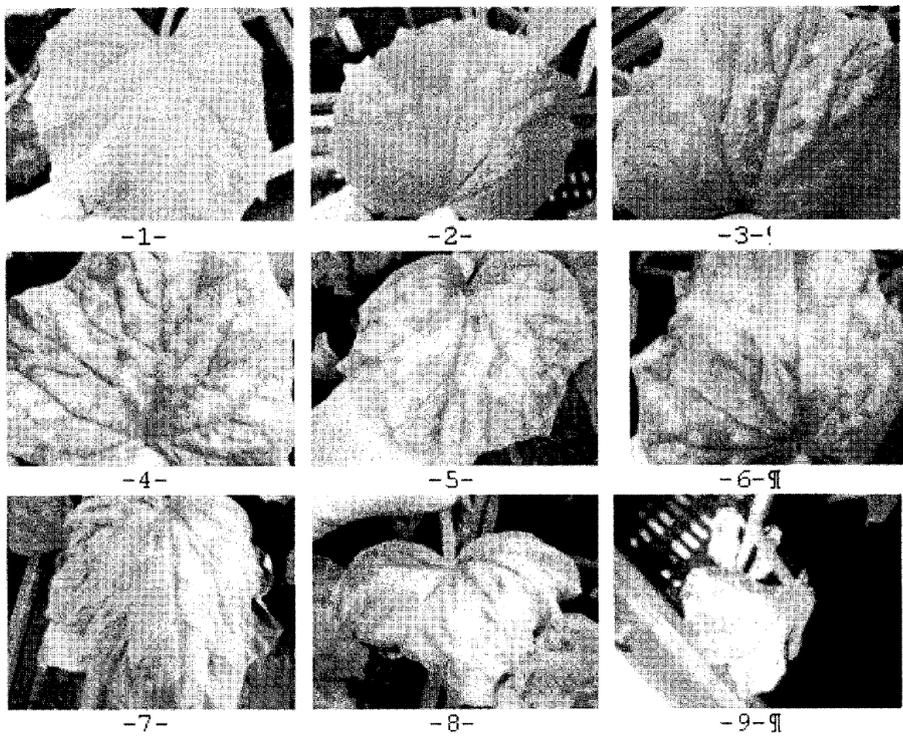


FIG. 5

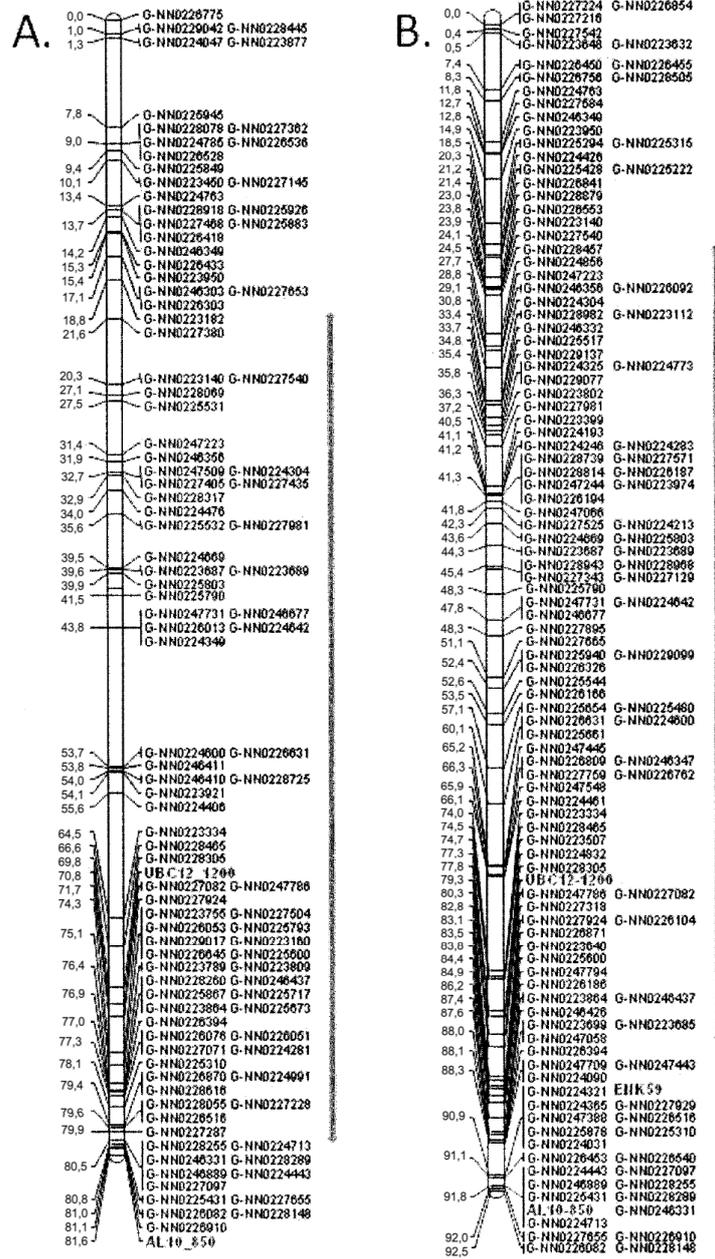


FIG. 5 (continuación)

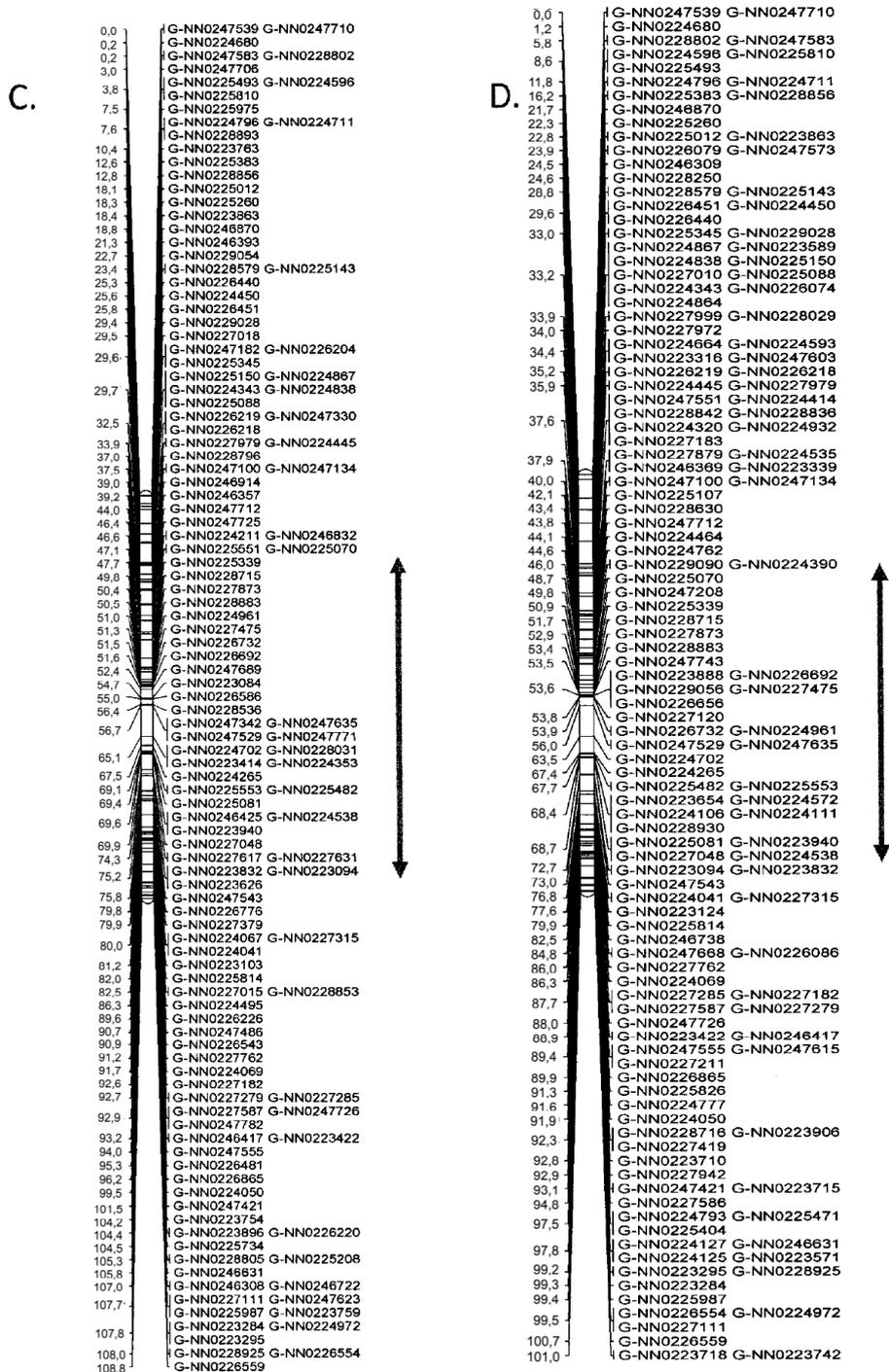


FIG 5 (continuación)

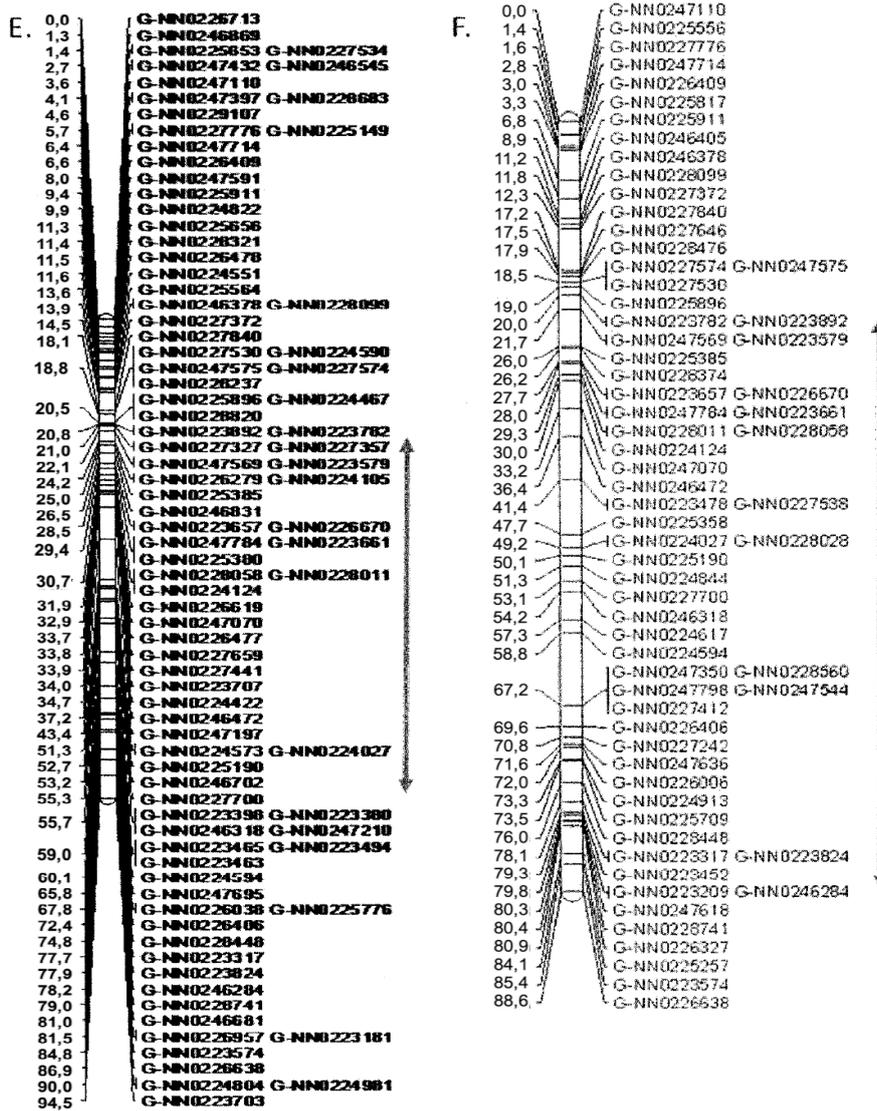


FIG. 6

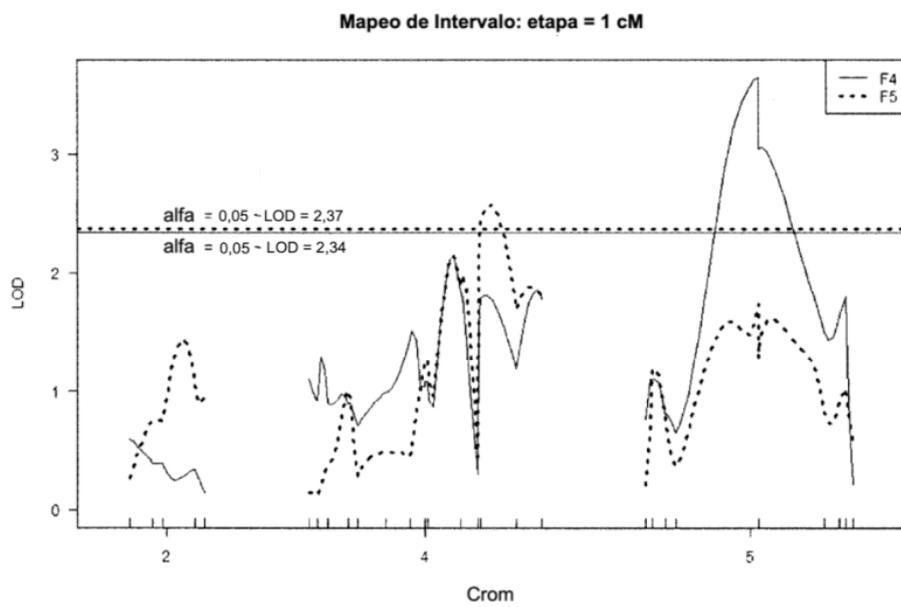


FIG. 7

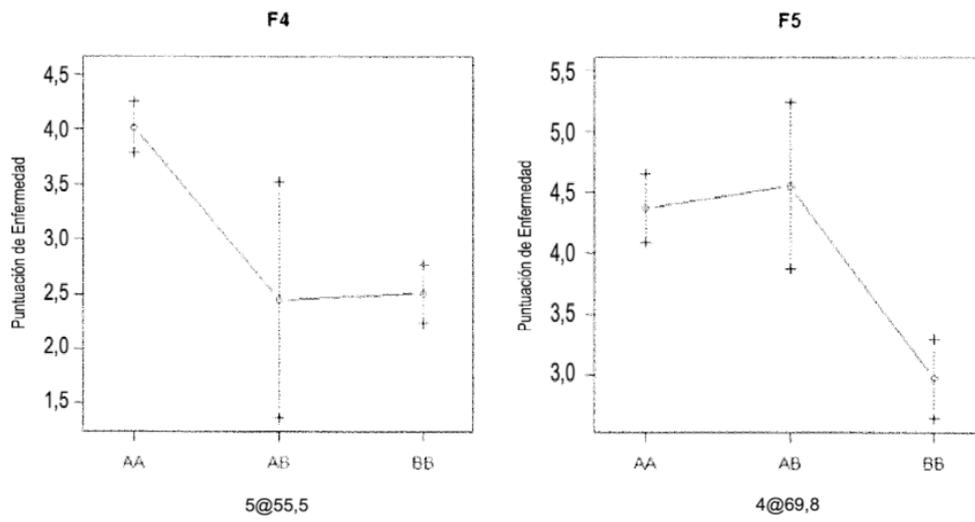


FIG. 8

