



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización
Industria y Comercio



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-137575

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

PLANTAS TO- TV RESISTENTES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

DE RUITER SEEDS R & D B.V.

DOMICILIO

CZ BERGSCHENHOEK, HOLANDA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

202074.

(FORMA P-10)



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-137575- -00000-0000

Fecha: 2008-12-29 16:01:43

Dep: 2020 NUECREACION

Tra: 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act: 411 PRESENTACION

Folios: 108

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 de 2004

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: DE RUITER SEEDS R & D B.V.
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Holanda.

Dirección: Leeuwenhoekweg 52,
2661 CZ Bergschenhoek,
Holanda

Domicilio: CZ Bergschenhoek,
Holanda

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Paulus Cornelis MARIS

Van Zuijland 11,
2731 GN Benthuisen,
Holanda

3. Johannes Hendrikus Maria BARTEN

Playa Serena,
Calle Aviación 122,
4740 Roquetas De Mar,
España

2. Anita Afke DE HAAN

Karel Doormanlaan 10,
2665 AT Bleiswijk,
Holanda

4. Johannes Franciscus Johanna Maria
VAN DEN HEUVEL

Coolhaven 237,
3015 GC Rotterdam,
Holanda

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/NL2007/050260

Fecha: 1 de junio de 2007

Publicación Internacional No. WO 2007/139386 A1

Fecha: 6 de diciembre de 2007

6

Título (54)

PLANTAS TO-TV RESISTENTES

7

Clasificación Internacional (51) A01H 001/000

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

US

NL

(32) Fecha

1 de junio de 2006

1 de junio de 2006

25 de abril de 2007

(31) Número de Solicitud

06076141.8

60/803,663

1033758

9

Comprobante de pago No.: 08-95,318

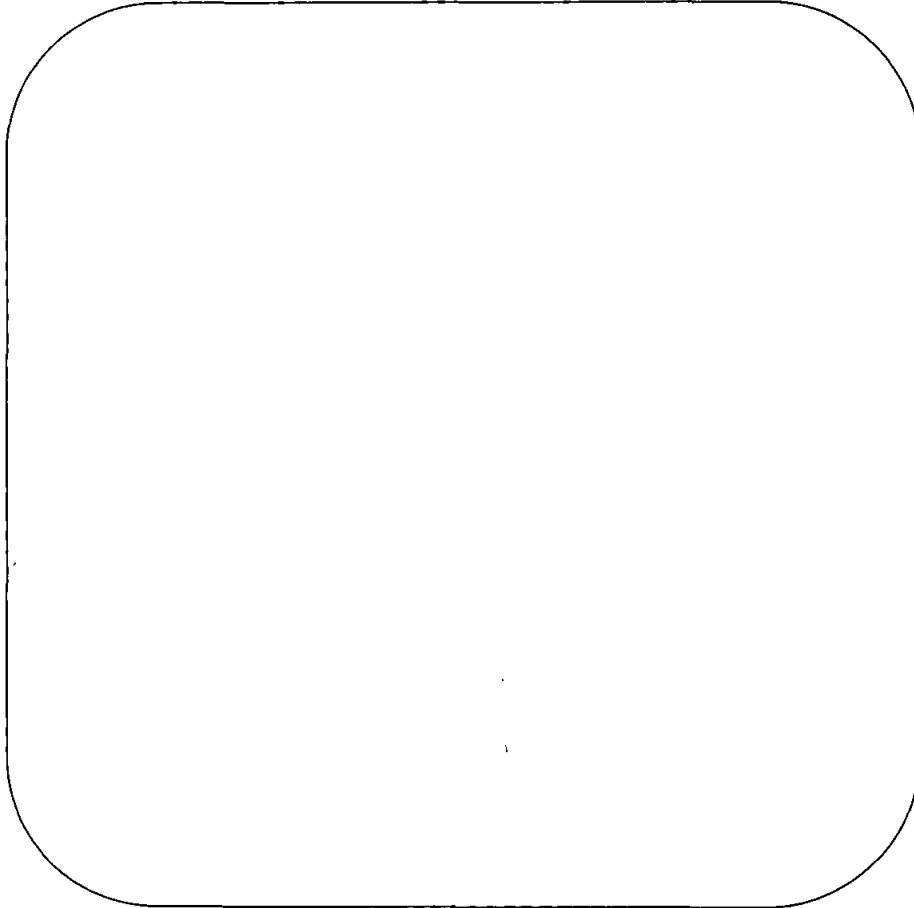
Fecha: 9 de diciembre de 2008

10

Anexos:

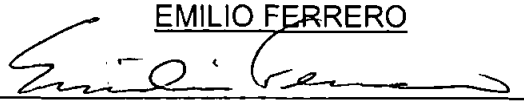
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/139386 A1

Descripción:

Páginas 39 en el idioma original

Páginas 37 en español

Reivindicaciones: Número (s) 29

Figuras: Número (s) 2

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

A
493
76021
6277

I, BOUDEWIJN HERMAN DYSERINCK, civil law notary, residing at The Hague, The Netherlands, do hereby certify that the attached Power of Attorney was signed by Willem Hendrik LINDHOUT and that he is authorized to sign for and on behalf of the private limited liability company De Ruiter Seeds Group B.V., which company is the Managing Director of the private limited liability company **De Ruiter Seeds R&D B.V.** and authorized to sign for and on behalf of **De Ruiter Seeds R&D B.V.**

The Hague, this 5th day of September 2007.



A P O S T I L L E

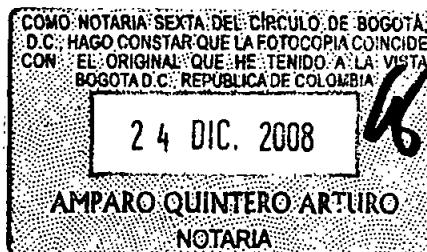
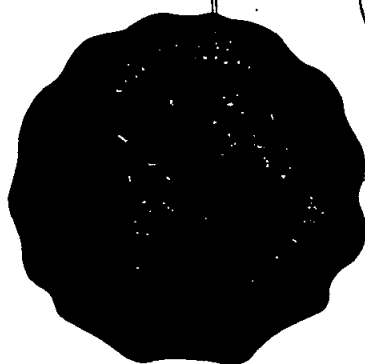
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pais: Los Países Bajos
El presente documento público
2. ha sido firmado por mr. B.H. Dyserinck
3. quien actúa en calidad de notario en 's-Gravenhage
4. y está revestido del sello/timbre del susodicho notario

Certificado

5. La Haya 6. el día 5 september 2007
7. por el Secretario Judicial del Tribunal de Distrito
8. bajo el número: 2007-4849-2
9. Sello/timbre: 10. Firma:

M.A. de Roode



P7091PC000

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, B - COLOMBIA

179

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

DE RUITER SEEDS R&D B.V.

domiciliado (s) en/of Leeuwenhoekweg 52, 2661 CZ

Bergschenhoek, Netherlands

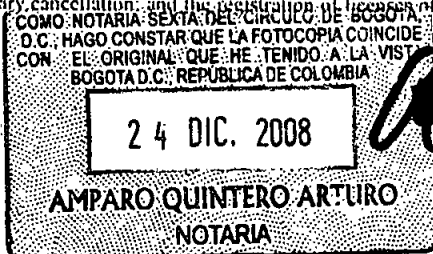
por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (unos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio,

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4ª N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs, the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of

CAVELIER ABOGADOS
WPG16029 / ID 103631 (MINUTA 12.1.1.2.5)



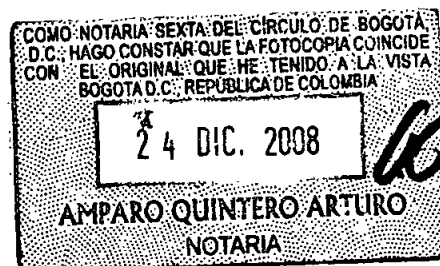
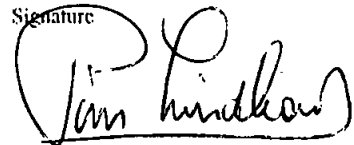
cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos que ha determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this August 6, 2007
en/in Bergschenhoek, The Netherlands
por/by Willem Hendrik Lindhout
Director R&D

Firma

Signature



CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de _____
 es auténtica: que el signatario desempeña actualmente el cargo
 de _____
 de la compañía _____
 sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a
 las leyes de _____
 que la dirección de dicha compañía es _____
 y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los
 documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en _____

El _____

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of _____
 is authentic, that the signatory currently acts in the position of _____
 of the company _____
 a company currently existing and organized under the laws of _____
 that the address is _____
 and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon
 examination of the corresponding documents.

Given and signed in _____

On _____

El Notario Público - The Notary Public
 (Firma-sello) (Signature-seal)

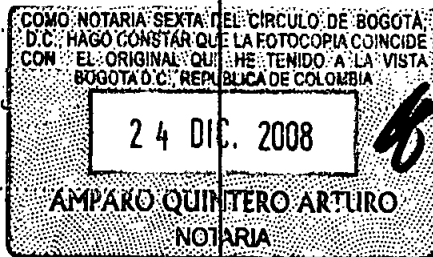
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: _____
 This public document
2. has been signed by _____
3. acting in the capacity of _____
4. bears the seal/stamp of _____

Certified

5. at _____
6. the _____
7. by _____
8. No. _____
9. Seal/stamp _____
10. Signature _____



8

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 27/09.07 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución No. 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en alemán y español, por el cual **DE RUITER SEEDS R&D B.V.** sociedad domiciliada en Leeuwenhoekweg 52, 2661 CZ, Bergschenhoek, Países Bajos, otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y DANIEL PEÑA.**

Dado y firmado el 6 de agosto de 2007

En Bergschenhoek, Países Bajos

Por Willem Hendrik Lindhout, Director de Investigación y Desarrollo (R&D)

Firma: [Firma ilegible]

YO, BOUDEWIJN HERMAN DYSERINCK, notario público, residente en La Haya, Países Bajos, por el presente certifico que el Poder anexo fue firmado por Willem Hendrik LINDHOUT y que él está autorizado para firma por y en nombre de la sociedad privada de responsabilidad limitada De Ruiter Seeds Group B.V., sociedad que es la directora administrativa de la sociedad privada de responsabilidad limitada **De Ruiter Seeds R&D B.V.** y autorizado para firmar por y en nombre de **D Ruiter Seeds R&D B.V.**

La Haya, 5 de septiembre de 2007

[Firma ilegible]

Sello del Sr. B.H. DYSERINCK

APOSTILLA otorgada en español en Países Bajos el 5 de septiembre de 2007 bajo el número **2007-4849-2**, firmado por M.A. de Roode.

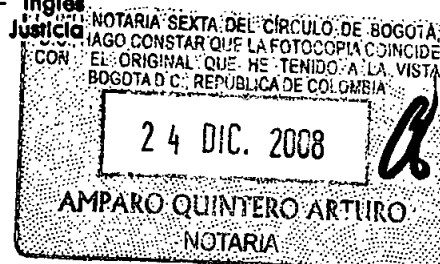
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 16029-841-001-2

SEP 27/07

MMAID-109145WPC16029

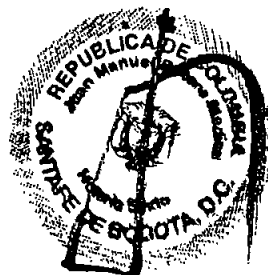
María E. Martelo
TRADUCCION No. 27/09.07
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia



COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA
 BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE
Maria Elvira Martelo
 COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
 EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
 SANTIAFE DE BOGOTA, 01 OCT 2007

NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD
 DEL TEXTO

665005
Maria Novelo
 AGENTE DE
 RELACIONES PUBLICAS



MINISTERIO DE
 RELACIONES PUBLICAS

2007 OCT -1 P 1:04

Quintero
 JEFE DE LEGALIZACION
 BOGOTA D.C.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
 D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
 CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
 BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
24 DIC. 2008
 AMPARO QUINTERO ARTURO
 NOTARIA

6

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 December 2007 (06.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/139386 A1

(51) International Patent Classification:
A01H 1/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(74) Agent: VAN LOON, C., J., J.; Johan de Wittlaan 7,
Vereenigde, NL-2517 JR Den Haag (NL).

(21) International Application Number:
PCT/NL2007/050260

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 1 June 2007 (01.06.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
06076141.8 1 June 2006 (01.06.2006) EP
60/803,663 1 June 2006 (01.06.2006) US
1033758 25 April 2007 (25.04.2007) NL

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): DE
RUITER SEEDS R & D B.V. [NL/NL]; Leeuwenhoek-
weg 52, NL-2661 CZ Bergschenhoek (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MARIS, Paulus,
Cornelis [NL/NL]; Van Zuijland 11, NL-2731 GN Ben-
thuisen (NL). DE HAAN, Anita, Afke [NL/NL]; Karel
Doormanlaan 10, NL-2665 AT Bleiswijk (NL). BARTEN,
Johannes Hendrikus Maria [NL/ES]; Playa Serena,
Calle Aviacion 122, E-04740 Roquetas De Mar (ES). VAN
DEN HEUVEL, Johannes Franciscus Johanna Maria
[NL/NL]; Coolhaven 237, NL-3015 GC Rotterdam (NL).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: TOTV-RESISTANT PLANTS

(57) Abstract: The present invention relates to a tomato plant having within its genome at least one allele of a gene that confers resistance to Tomato torrado virus (ToTV), said virus having been deposited with the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH on 24 November 2004 under depositors reference number ToTV-EOI (DSM 16999).

WO 2007/139386 A1

4
10

Title: ToTV-resistant plants

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to virus resistant plants and to methods of producing such plants. In particular, the method relates to plants that are resistant to Tomato torrado virus (ToTV), to methods of producing such plants and to plants and plant parts thus obtained.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The tomato *Solanum lycopersicum* (formerly *Lycopersicon esculentum*) is susceptible to a large number of viral species. Some of the most prominent tomato viruses include *Tomato spotted wilt virus* (TSWV; genus *Tospovirus*); *Pepino mosaic virus* (PepMV; genus *Potexvirus*), and *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV; genus *Begomovirus*). The damage that these diseases inflict on the plant range from discoloration of leaves and necrotic lesions, to severe crop loss and death of the plant.

The ability to provide resistant plants is of utmost importance to commercial breeders, and for some of the economically most damaging viruses, resistant plant varieties have been produced. However, from time to time, new viruses emerge that may inflict considerable damage on crops.

In 1996 a new tomato virus was reported which had infected tomato plants in the USA and Italy since 1993, and was named *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV; genus *Crinivirus*; Duffus *et al.*, 1996). Another new tomato virus of the same genus was reported in 1998. This virus was shown to have infected tomato plants in the USA since 1989 and was named *Tomato chlorosis virus* (ToCV; Wisler *et al.*, 1998). Both these new viruses proved to be spread by a whitefly, the insect being a very effective disease-transmission vector.

It is generally believed that the geographic distribution of known viruses will increase and that new viruses will continue to appear, partly as a result of recombination of different viruses to form new strains or new viruses. The development of resistant cultivars can play an important role in the successful management of these diseases.

Recently, a new virus was discovered on tomato plants from Spain, which caused symptoms (locally known as the disease "torrado") that could not be attributed

to any known virus. The plants exhibited necrotic lesions on leaves and brown rings on fruits and showed reduced growth. Serological tests (ELISA) indicated the presence of *Pepino mosaic virus* (PepMV). Electron microscopic investigations indeed revealed the rod-like particles typical for potexviruses. However, also spherically
5 shaped viral particles were found in infected leaf tissue. The inventors were able to separate the new virus from the complex with PepMV. The new virus was tentatively named Tomato torrado virus (ToTV), was deposited with the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH on 24 November 2004 under depositors reference number ToTV-E01 (DSM 16999), and is the causative agent of diseases
10 affecting tomato known as "torrado" (Spain), "marchitez" or "chocolate" (Mexico and Guatemala). It is believed that the virus is also capable of causing disease symptoms which are similar to those caused in tomato in other genera of *Solanum*, notably in *Capsicum* spp. (Pepper) and *Solanum melongena* (Aubergine).

At present there are no plants known that harbour specific resistance to this
15 new virus, while there is a need for developing such resistant plants.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present inventors have now discovered tomato plants that are resistant to ToTV. They found that, upon exposure of the plants to the virus, disease-symptoms
20 remained absent, and that viral particles, or viral RNA could not be detected in these plants. As indicated below, this response is defined as resistant. Such plants are of pivotal importance in the development of commercially valuable varieties of cultivated tomato that are resistant to the new virus, especially when the genetic elements responsible or associated with the resistance trait, and exchanged among plants
25 during crossing, can be followed and monitored during the breeding process. Such monitoring helps to improve the efficiency of breeding and can greatly improve the time-to-market for newly developed resistant varieties. Through crossing experiments, it was discovered that the gene responsible for the resistance to ToTV was homozygously present in the resistant plants while heterozygous plants were
30 susceptible to ToTV infection. Thus, it was discovered that ToTV resistance is conferred by a recessive gene. Still, plants that contain both forms of the allele, i.e. heterozygous plants, are equally useful to plant breeders as they may be used as parents in crosses and selfings to produce homozygous offspring plants.

In a first aspect, therefore, the present invention relates to a tomato plant having within its genome at least one allele of a gene that confers resistance to Tomato torrado virus (ToTV), said virus having been deposited with the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH on 24 November 2004 under depositors reference number ToTV-E01 (DSM 16999). ToTV resistant tomato plants were hitherto unknown.

Upon subsequent experimentation, the inventors found that the resistance in these ToTV resistant tomato plants was closely linked to a number of AFLP markers. Without wishing to be bound by any theory, and despite the fact that the location of most of these markers on the genome is yet to be determined, it is believed that the gene(s) responsible for the trait is (are) located on chromosome 4. Therefore, in a preferred embodiment of said first aspect, the allele that comprises a gene that confers resistance to Tomato torrado virus (ToTV) is located in a genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, and/or P13/M38-F-311/313, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313.

In a preferred embodiment of said first aspect, said allele is located on chromosome 4, preferably in a genomic region positioned between AFLP markers P14/M49-F-282 and P11/M35-F-216.

In another preferred embodiment of said first aspect, said allele is present in homozygous form, which results in the plant expressing the resistant phenotype.

In still another preferred embodiment of said first aspect, said tomato plant is a plant of the species *Solanum lycopersicum*, preferably a cultivated tomato plant.

In yet another preferred embodiment of said first aspect, said resistance is expressed as a resistance to the establishment of an infection with ToTV upon exposure of said plant to at least the minimal infective dosage of the virus. The skilled person will understand that the minimal effective dosage can be determined by routine experimentation on susceptible plants.

In yet another preferred embodiment of said first aspect, said plant is identified in a resistance bioassay involving infection with ToTV, or wherein said plant is identified by screening for the presence of at least one molecular marker linked to said allele of said ToTV resistance gene.

In yet another preferred embodiment of said first aspect, said plant is produced by a method involving screening for the presence of at least one molecular marker linked to said allele of said ToTV resistance gene

In a further aspect, the present invention relates to a plant part derived from a
5 plant of the present invention. Examples of plant parts include, but are not limited to, single cells and tissues from pollen, ovules, leaves, embryos, roots, root tips, anthers, flowers, fruits, stems shoots, and seeds; as well as pollen, ovules, leaves, embryos, roots, root tips, anthers, flowers, fruits, stems, shoots, scions, rootstocks, seeds, protoplasts, calli, and the like. Preferably said part is a fruit or seed. Other preferred
10 embodiments of plant parts include parts for vegetative propagation including such preferred parts as microspores, pollen, ovules, leaves, embryos, roots, root tips, anthers, flowers, fruits, stems shoots, stems, shoots, scions, rootstocks, protoplasts, calli, and meristemic tissue and the like.

In a further aspect, the present invention relates to a method for selecting a
15 tomato plant that is resistant to the Tomato torrado virus (ToTV) as defined herein, said method comprising the steps of:

- a) providing an inoculum of said virus;
- b) exposing a tomato plant to said inoculum;
- c) allowing for a sufficient incubation time, and
- 20 d) selecting said tomato plant in case no infection establishes in said plant upon lapse of said incubation time.

In a further aspect, the present invention relates to a method for selecting a tomato plant having within its genome at least one allele of a gene that confers resistance to the Tomato torrado virus (ToTV) as defined herein, said method
25 comprising the step of screening the genomic DNA of a tomato plant for the presence of a genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, and/or P13/M38-F-311/313, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/
30 313.

In still a further aspect, the present invention relates to a method for the production of a tomato plant comprising selecting a plant having within its genome at least one allele (of a gene) that confers resistance to the Tomato torrado virus (ToTV)

as defined herein by performing a method for selecting a tomato plant according to the present invention and crossing said selected plant with itself or another tomato plant to produce seed, and growing said seed into a tomato plant.

In still a further aspect, the present invention relates to a method for the
5 production of a tomato plant that is resistant to the Tomato torrado virus (ToTV) as defined herein, said method comprising the step of:

- a) selecting a plant having within its genome at least one allele of a gene that confers resistance to said Tomato torrado virus (ToTV) by performing a method for selecting a tomato plant according to the present invention;
- 10 b) crossing said selected plant with another tomato plant or with itself to produce seed;
- c) growing said seed into tomato plants to produce offspring plants;
- d) optionally repeating the crossing and growing steps of steps b) and c), and
- e) selecting from amongst the offspring plants a plant wherein said allele is
15 present in homozygous form.

In a preferred embodiment of said method, the selection in step e) is performed by screening the DNA of said offspring plant for the homozygous presence of said genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, and/or P13/M38-F-311/313, preferably to AFLP
20 markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313. Alternatively, the selection in step e) is performed by a resistance bioassay using said ToTV virus or any other suitable method as described herein.

In another preferred embodiment of said method, the tomato plant is a plant of
25 the species *Solanum lycopersicum*, more preferably a cultivated tomato plant.

In still other aspects, the present invention relates to a tomato plant obtainable by a method according to the present invention and to a plant part, preferably a fruit or seed, derived from said novel and inventive tomato plant. Said plant part in an alternative preferred embodiment comprises plant parts suitable for
30 vegetative propagation.

In still other aspects, the present invention relates to the use of the allele that confers resistance against ToTV, which allele is located in a genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131,

P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900 on chromosome 4 of tomato:

- 5 - to select ToTV resistant tomato plants, or
 - to confer resistance to ToTV in a ToTV susceptible tomato variety by increasing the frequency of the presence of the resistant allele in said variety.

In still other aspects, the present invention relates to the use of a ToTV resistant plant for enhancing the yield of and/or for preventing yield loss in said plant
10 resulting from ToTV infection, wherein said ToTV resistant plant is characterized by the homozygous presence of the allele located in a genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313, most
15 preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900 on chromosome 4 of tomato.

In still other aspects, the present invention relates to the use of a seed of a ToTV resistant plant of the present invention, for producing a ToTV resistant plant or for preventing the occurrence of torrado disease (or a related disease such as
20 marchitez or chocolate spot disease) in a plant or in a population of plants.

In still other aspects, the present invention relates to the use of a plant comprising at least one allele that confers resistance to ToTV, or that is homozygous for an allele that confers resistance to ToTV, wherein said allele is located in a genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-
25 583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900 on chromosome 4 of tomato, as a ToTV resistant tomato plant or as a parent plant in breeding programs
30 aimed at providing other plants with the ToTV resistant phenotype that results from the homozygous presence of said allele.

16
In still other aspects, the present invention relates to the use of marker P11/M35-F-216, P13/M38-F-311/313 and/or C2_At5g25900 for detecting the presence of an allele that confers resistance to ToTV in a plant. Such use would generally involve nucleic acid detection methods including such steps of isolating DNA, amplifying said isolated DNA with the marker-specific primers, and checking the amplified DNA fragment for the expected length in base pairs, optionally after digesting said amplified DNA fragment, to reveal the presence of nucleotide polymorphisms associated with the resistance allele.

In preferred embodiments of the above-described use aspects of the present invention said plant is preferably a tomato plant, most preferably a plant of a commercially valuable tomato plant, such as a tomato plant comprising commercially desirable characteristics as described *inter alia* herein.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 show a schematic map of the tomato genome representing chromosome 4, and indicating the most recent locations of a number of well known markers.

Figure 2 shows an agarose gel with PCR fragments digested with a specific restriction enzyme to indicate the presence or absence of the resistance allele for ToTV resistance as described in Example 2.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

As used herein, the term "allele(s)" means any of one or more alternative forms of a gene, all of which alleles relate to at least one trait or characteristic. In a diploid cell or organism, the two alleles of a given gene occupy corresponding loci on a pair of homologous chromosomes. Since the present invention relates to methods that comprise steps for identifying genomic regions that may comprise one or more genes, but also regulatory sequences, it is in some instances more accurate to refer to "haplotype" (i.e. an allele of a chromosomal segment) instead of "allele", however, in those instances, the term "allele" should be understood to comprise the term "haplotype".

A "gene" is defined herein as a hereditary unit consisting of a sequence of DNA that occupies a specific location on a chromosome and that contains the genetic instruction for a particular characteristics or trait in an organism.

A "locus" is defined herein as the position that a given gene occupies on a chromosome of a given species.

As used herein, the term "heterozygous" means a genetic condition existing when different alleles reside at corresponding loci on homologous chromosomes.

As used herein, the term "homozygous" means a genetic condition existing when identical alleles reside at corresponding loci on homologous chromosomes.

As used herein, the term "molecular marker" refers to an indicator that is used in methods for visualizing differences in characteristics of nucleic acid sequences. Examples of such indicators are restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers, amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers, single nucleotide polymorphisms (SNPs), microsatellite markers (e.g. SSRs), sequence-characterized amplified region (SCAR) markers, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers or isozyme markers or combinations of the markers described herein which defines a specific genetic and chromosomal location.

As used herein, the term "tomato" means any plant, line or population of *Lycopersicon* including but not limited to *Lycopersicon cerasiforme*, *Lycopersicon cheesmanii*, *Lycopersicon chilense*, *Lycopersicon chmielewskii*, *Lycopersicon esculentum* (or *Solanum lycopersicum*), *Lycopersicon hirsutum*, *Lycopersicon parviflorum*, *Lycopersicon pennellii*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, or *Solanum lycopersicoides*. Wild relatives of the modern tomato have been classified within the *Lycopersicon* genus, like *L. pennellii*, *L. hirsutum*, *L. peruvianum*, *L. chilense*, *L. parviflorum*, *L. chmielewskii*, *L. cheesmanii*, *L. cerasiforme*, and *L. pimpinellifolium*. Over the past few years, there has been debate among tomato researchers and botanists whether to reclassify the names of these species. The newly proposed scientific name for the modern tomato is *Solanum lycopersicum*. Similarly, the names of the wild species may be altered. *L. pennellii* may become *Solanum pennellii*, *L. hirsutum* may become *S. habrochaites*, *L. peruvianum* may be split into *S. 'N peruvianum'* and *S. 'Callejon de Huayles'*, *S. peruvianum*, and *S. corneliomuelleri*, *L. parviflorum* may become *S. neorickii*, *L. chmielewskii* may become *S. chmielewskii*, *L. chilense* may become *S. chilense*, *L.*

cheesmaniae may become *S. cheesmaniae* or *S. galapagense*, and *L. pimpinellifolium* may become *S. pimpinellifolium* (Solanacea Genome Network (2005) Spooner and Knapp; http://www.sgn.cornell.edu/help/about/solanum_nomenclature.html).

A plant according to the present invention exists in nature. Yet it was
5 identified as a result of a technical process. The present invention reveals two principle methods of identifying such a plant. In a first method the plant is identified by using a resistance bioassay involving exposure of a candidate plant to an effective dosage of Tomato torrado virus (ToTV) (by mechanical inoculation or exposure in the field) as defined herein. When the candidate plant remains free of disease, the
10 symptoms of which include necrotic lesions finalizing in burn-like, full necrosis of plant material especially leafs and death of the plant and/or concentric rings of necrotic spots on fruits, said plant is said to be resistant. The plant identified by using this method comprises two alleles comprising a gene that confers resistance to Tomato torrado virus (ToTV), and is consequently homozygous for the trait.

15 The term "resistant to ToTV" is meant to include resistance to ToTV, including the deposited strain ToTV-E01 (DSM 16999), as well as to a related virus. A related virus in the context of the present invention is not only a virus belonging to the same taxonomic genus as ToTV, but can be defined as a virus to which resistance is conferred by the resistance allele described herein.

20 A plant of the present invention comprises at least one gene that confers resistance to ToTV. The locus of the gene is linked to a number of AFLP markers as herein identified. However, the location of many of these AFLP markers on the genomic map of tomato is yet unknown. Therefore, the position of the gene in the genome is not entirely certain. Since marker P14/M49-F-282 is tentatively located on
25 chromosome 4, it is strongly suggested that the locus is located on chromosome 4. When comparing the location of publicly known markers to those of P14/M49-F-282, it appears that the gene is located in a region of which the boundaries are set by CT264 (Tomato EXPEN 2000 position 86 cM) and marker TG163 Tomato EXPEN 2000 position 135 cM). A plant of the present invention can thus be characterized in having
30 a ToTV resistance gene located on chromosome 4 on a position between markers CT264 and TG163.

In a more detailed analysis of markers present in an experimental tomato population comprising resistant and susceptible plants, it was found that two markers

were polymorphic among the population and highly correlated with the presence or absence of the resistant allele: COSII/CAPS marker C2_At5g25900 (see Example) and a bi-allelic marker referred to as P13/M38-F-311/313. These markers are positioned on Chromosome 4 of tomato and it could be calculated from the recombination frequency observed that these markers are separated by a distance of approximately 3 cM. The position of C2_At5g25900 is provided in Figure 1. The position of P13/M38-F-311/313 relative to C2_At5g25900 could not be established due to the absence in the population tested of other polymorphic markers with known map positions. Therefore, it can thusfar be concluded that the gene that confers resistance to ToTV in tomato is associated with a region characterized by polymorphic markers C2_At5g25900 (in particular the marker producing a 420 bp and 260 bp fragment when digested with MseI, which marker is linked to the resistant allele) and P13/M38-F-311/313 (in particular P13/M38-F-313, which is linked to the resistant allele, said region covering a stretch of DNA on chromosome 4 that represents a genetic distance of approximately 3 cM, more preferably between 0 and 10cM, still more preferably between 0 and 3,6 cM, most preferably less than 3 cM.

The skilled person will be able to discern the orientation of the two markers relative to each other on the genetic map of tomato (e.g. similar to that in Fig. 2, when the distance of each to third marker can be determined. Such experiments are well within reach of the skilled person.

The plants of the present invention are found to be resistant to the viral agent that causes the tomato disease known in Mexico by the name of "marchitez". It is believed that this viral agent is the same as that deposited under accession number DSM 16999 and assigned the name Tomato torrado virus (ToTV). ToTV is the causative agent of a similar disease in tomato in Spain called "torrado". It was found that the markers as described herein that are linked to resistance to the ToTV virus deposited under accession number DSM 16999 are also linked to resistance to "marchitez". Therefore, the plants as defined herein are resistant to "torrado" as well as to "marchitez". Thus the plants as described herein confer resistance to:

- all viruses that are the causative agents of diseases which result in diseases in tomato plants with the same or similar symptoms as those caused by the deposited virus ToTV DSM 1699;

- all plant viruses that belong to the same taxon as that of ToTV (of which the taxonomic ranking still needs to be determined), preferably the plant viruses of the same family, more preferably of the same genus, still more preferably of the same species;

5 - ToTV DSM 16999.

In an alternative method of identifying a plant of the present invention in nature, the plant is identified by screening for the presence of at least one molecular marker linked to said at least one allele of said ToTV resistance gene. The present invention now discloses various AFLP markers which are suitable for use in such a screening assay, as they have been found to be linked to various extents to the presence of the resistance gene in tomato plants. A suitable molecular marker may be selected from the group consisting of AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, and P13/M38-F-311/313, preferably from the group consisting of AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and
10 P13/M38-F-311/313, most preferably from the group consisting of AFLP markers P11/M35-F-216 and P13/M38-F-311/313. The Example describes the coupling between these markers and the resistance trait in more detail.

The invention further relates to a method for identifying a ToTV-resistant plant, or part thereof. There are various possibilities of identifying ToTV-resistant plants. In a first set of embodiments of such a method, active/infectious virus or full-length infectious clones may be used, whereas in an alternative embodiment only virus-detection means are used.
20

A first step of a method for identifying a ToTV-resistant plant using active/infectious virus comprises exposing a plant or plant part, such as a leaf or stem segment, to a infective dosage of ToTV, the aim of which is to achieve an infection. The exposure may in many cases involve the establishment of physical contact. An infective dosage may vary between plants and between ToTV-isolates tested. Theoretically, an amount of about 1 to 10 to an amount of about 500-5000 viral particles of said virus or the nucleic acids thereof will be sufficient. Infection in this way may be achieved by mechanical inoculation of purified virus particles or virus nucleic acid on healthy plants or for instance by passive inoculation via exposure to infected plants.
25 30

Alternatively, infection may be achieved by, for instance:

- growing a healthy scion on a ToTV-infected rootstock, or vice versa;
- exposing a healthy plant to transmission vectors containing the virus (including infected plants, *e.g.* parasitic plants like *Cuscuta* spp.);
- introducing into a healthy plant an expression vector harbouring a coding region of the ToTV virus genome;
- the use of agro-infectious clones, such as *Agrobacterium tumefaciens* strains containing an expression vector harbouring a coding region of the ToTV virus genome.

In the context of the present invention, methods for exposing a plant or plant part to an infective dosage of ToTV are not limited to any particular method.

As stated, infection may comprise mechanical inoculation of the virus on healthy plants. For instance, a portion of a diseased leaf may be rubbed directly onto a leaf of a plant that is to be infected. In an alternative procedure, an inoculum may for instance be prepared by grinding virus-containing plant tissue, preferably young leaves showing symptoms, with a mortar and pestle, or any other suitable type of homogeniser, in for instance a buffer suitable for inoculation (*e.g.* a 0.03 M phosphate buffer, pH 7.7). After grinding, the obtained homogenate (the sap) is preferably filtered, *e.g.* through cheese cloth. The sap may then be inoculation, for instance by gently contacting leaves with an amount of the sap. The leaves are preferably pre-treated in order to damage the lower epidermis and enhance entry of the virus. This may for instance be achieved by pre-dusting the leaves with carborundum powder. Excessive wounding is preferably avoided. Preferably a carborundum powder is used having microscopically small angular particles of silicon carbide (400-500 mesh). Carborundum powder may also be added directly to the sap, in which case the pre-treatment is omitted. The sap may, for instance, be applied by the forefinger, a pad of sap-soaked foam or fabric, or even with the pestle used for grinding, a glass spatula, a stiff brush, or a spray gun. After inoculation, the leaves are preferably immediately washed with water.

A second step of a method for identifying a ToTV-resistant plant comprises identifying said plant as a ToTV-resistant plant when, after said exposure, either i) disease-symptoms in said plant or plant part remain absent or are delayed in expression or are at least reduced in severity or are localized relative to a susceptible and/or sensitive control plant, and/or ii) ToTV virus or ToTV genomic sequences are not present in said plant or plant part or the presence of ToTV virus is at least

quantitatively reduced in said plant relative to a susceptible control plant. As used herein the term localized means limited to the inoculated leaf.

Determining the development of ToTV-induced disease-symptoms in infected plants may be performed by quantitative methods, *e.g.* wherein the period required
5 for the development of discernible (*e.g.* visible) disease-symptoms is noted, or by qualitative methods wherein, after a certain period has lapsed, the plant is inspected for symptom expression and the presence or severity of the symptoms is indicated.

In addition to determining the development of ToTV-induced disease-symptoms or as an alternative thereto, depending on the type of ToTV-resistance to be
10 detected, the presence of the virus is detected in the plant or plant part. In order to detect the absence of virus in the test plants, any method may in principle be used. For instance, a method may be employed wherein a ToTV specific antibody, primer-set or probe according to the present invention is used. Alternatively, a portion of the test plant may be brought into contact with a susceptible indicator plant (*e.g.* *N. hesperis* '67A') to establish whether virus is present or absent in the test plant. The
15 skilled person will understand that for such methods it is important to decontaminate the surface of the test plant, in order to distinguish between a transmission vector, a tolerant test-plant and a resistant test plant, since only the presence of virus in the plant cells needs to be established.

20 In performing the second step of a method for identifying a ToTV-resistant plant, the following results may be obtained. If, after successful inoculation (*e.g.* after the establishment of a plant-virus contact under conditions that would result in infection in a susceptible and sensitive control plant):

i) disease-symptoms remain absent; or viral particles, or viral RNA cannot be
25 detected: the plant is resistant;

ii) disease-symptoms are delayed or reduced in severity; or systemic low titres of viral particles or viral RNA can be detected: the plant is partially resistant;

iii) disease-symptoms are severe, but remain local, limited to the inoculated leaf and do not systemically spread beyond inoculated tissue; or viral particles, or
30 viral RNA can only be detected locally: the plant is hypersensitive;

iv) if disease-symptoms remain absent; and viral particles, or viral RNA can be detected: the plant is tolerant.

v) if the plant develops disease-symptoms and has high systemic virus titres, then the plant is susceptible and sensitive. Examples of such plants are the plants from which the virus of the present invention was isolated. These plants may serve as suitable control plants in methods of the present invention.

5 For the purpose of producing resistant plants, and from a viewpoint of phytosanitation, only outcome i), ii) and iii) may be considered of interest. For the purpose of obtaining plants suitable for the production of symptomless crops and products, outcome iv) may also be of particular commercial interest.

10 In an alternative embodiment of a method for identifying a ToTV-resistant plant only virus-detection means are used. For instance, a ToTV-resistant plant may be identified in the field by observing or identifying a symptomless plant among symptomatic plants and determining the absence of virus in said plant by performing a virus detection method. When such a method is performed it is preferred that a ToTV-selective polynucleotide or an antibody is used. Preferably, a method of
15 identifying a ToTV-resistant plant requires the use of either the virus or virus-selective polynucleotide or antibody.

The present invention now discloses still a further method of identifying a ToTV-resistant plant, by determining the homozygous presence of markers linked to a putative ToTV resistance gene, for which markers several examples are provided.

20 The invention further relates to a method of producing a ToTV-resistant plant, or part thereof. Once a ToTV-resistant plant has been identified, this plant may serve as a donor plant of genetic material which is to be transferred from said donor plant to a recipient plant in order to provide said recipient plant with the genetic material. Transfer of genetic material from a donor plant to a recipient plant may occur by any
25 suitable method known in the art. The genetic material will in most cases be genomic material. It is important however, that at least the resistance-conferring parts of the donor plant's genome are transferred. In the absence of methods for determining which parts of the donor plant's genome confer the ToTV resistance, the transfer may suitably occur by transferring complete chromosomes. Preferably, the ToTV-resistant
30 plant serves as a male or female parent plant in a cross for producing resistant offspring plants, the offspring plant thereby receiving genomic material from the resistant donor and acting as the recipient plant. Although a susceptible parent in

crosses is *sensu stricto* not necessarily a recipient plant, such a susceptible parent will herein also be included in the term recipient plant.

In a method for producing a ToTV-resistant plant, protoplast fusion can also be used for the transfer of resistance-conferring genomic material from a donor plant to a recipient plant, i.e. as a manner of crossing said plants. Protoplast fusion is an induced or spontaneous union, such as a somatic hybridization, between two or more protoplasts (cells of which the cell walls are removed by enzymatic treatment) to produce a single bi- or multi-nucleate cell. The fused cell that may even be obtained with plant species that cannot be interbred in nature, is tissue cultured into a hybrid plant exhibiting the desirable combination of traits. More specifically, a first protoplast can be obtained from a tomato plant or other plant line that exhibits resistance to infection by ToTV. For example, a protoplast from a ToTV-resistant tomato line may be used. A second protoplast can be obtained from a susceptible second plant line, optionally from another plant species or variety, preferably from the same plant species or variety, that comprises commercially desirable characteristics, such as, but not limited to disease resistance, insect resistance, valuable fruit characteristics, etc. The protoplasts are then fused using traditional protoplast fusion procedures, which are known in the art to produce the cross.

Alternatively, embryo rescue may be employed in the transfer of resistance-conferring genomic material from a donor plant to a recipient plant i.e. as a manner of crossing said plants. Embryo rescue can be used as a procedure to isolate embryo's from crosses wherein plants fail to produce viable seed. In this process, the fertilized ovary or immature seed of a plant is tissue cultured to create new plants (this method is described in detail in Pierik, 1999).

A method of producing a ToTV-resistant plant thus comprises in one embodiment the steps of identifying a ToTV-resistant donor plant or a plant comprising at least one allele of the resistance gene (a carrier plant) as described herein and crossing said ToTV-resistant donor plant or said carrier plant with a recipient plant. Subsequently, by further crossing and selfing, homozygous plants can be obtained that are resistant to the virus.

A method of producing a ToTV-resistant plant further comprises the step of selecting from offspring plants a resistant plant by performing a method for identifying a ToTV-resistant plant as described earlier.

Preferably, said recipient plant is a tomato plant of the species *Solanum lycopersicum*, more preferably an *S. lycopersicum* plant that possess commercially desirable characteristics. The recipient plant may be a ToTV-susceptible plant, a ToTV sensitive plant or a ToTV resistant plant. As explained above, the choice of the
5 plant is determined by the fact that the resistance trait is recessive. The skilled person is aware of the various methodologies available to resolve such issues.

Also an aspect of the present invention is a ToTV-resistant plant, or a part thereof, obtainable by a method of the invention.

One method for producing a ToTV-resistant plant may comprise the transfer
10 by introgression of a resistance-conferring nucleic acid sequence from a ToTV-resistant donor plant or a plant having the resistance gene in heterozygous form into a recipient plant by crossing said plants.

In one method, which is referred to as pedigree breeding, a donor plant that exhibits resistance to ToTV (homozygous) may be crossed with a recipient plant that
15 preferably exhibits commercially desirable characteristics, such as, but not limited to, disease resistance, insect resistance, valuable fruit characteristics, etc. The resulting plant population (representing the F₁ hybrids) is then self-pollinated and allowed to set seed (F₂ seeds). The F₂ plants grown from the F₂ seeds are then screened for resistance to ToTV or for homozygous presence of markers linked to the resistance
20 gene. Thus, the offspring population can be screened in a number of ways.

Production of ToTV-resistant tomato plants by transgenic methods

According to another aspect of the present invention, a nucleic acid (preferably DNA) sequence comprising at least one of the markers linked to the ToTV resistance
25 gene as identified herein, may be used for the production of a ToTV-resistant tomato plant. Once identified in a suitable donor tomato plant, the nucleic acid sequence that comprises a gene for ToTV-resistance, may be transferred to a suitable recipient plant by any method available. For instance, the said nucleic acid sequence may be transferred by crossing a ToTV-resistance donor tomato plant with a susceptible
30 recipient tomato plant (i.e. by introgression), by transformation, by protoplast fusion, by a doubled haploid technique or by embryo rescue or by any other nucleic acid transfer system, optionally followed by selection of offspring plants comprising the gene heterozygous or homozygous and/or exhibiting ToTV-resistance. For transgenic

26

methods of transfer a nucleic acid sequence comprising a gene for ToTV-resistance, may be isolated from said donor plant by using methods known in the art and the thus isolated nucleic acid sequence may be transferred to the recipient plant by transgenic methods, for instance by means of a vector, in a gamete, or in any other
5 suitable transfer element, such as a ballistic particle coated with said nucleic acid sequence.

Plant transformation generally involves the construction of an expression vector that will function in plant cells. In the present invention, such a vector comprises a nucleic acid sequence that comprises a gene for ToTV-resistance, which
10 vector may comprise a ToTV-resistance-conferring gene that is under control of or operatively linked to a regulatory element, such as a promoter. The expression vector may contain one or more such operably linked gene/regulatory element combinations, provided that at least one of the genes contained in the combinations encodes for ToTV-resistance. The vector(s) may be in the form of a plasmid, and can be used,
15 alone or in combination with other plasmids, to provide transgenic plants that are resistant to ToTV, using transformation methods known in the art, such as the *Agrobacterium* transformation system.

Expression vectors can include at least one marker gene, operably linked to a regulatory element (such as a promoter) that allows transformed cells containing the
20 marker to be either recovered by negative selection (by inhibiting the growth of cells that do not contain the selectable marker gene), or by positive selection (by screening for the product encoded by the marker gene). Many commonly used selectable marker genes for plant transformation are known in the art, and include, for example, genes that code for enzymes that metabolically detoxify a selective chemical agent which
25 may be an antibiotic or a herbicide, or genes that encode an altered target which is insensitive to the inhibitor. Several positive selection methods are known in the art, such as mannose selection. Alternatively, marker-less transformation can be used to obtain plants without mentioned marker genes, the techniques for which are known in the art.

30 One method for introducing an expression vector into a plant is based on the natural transformation system of *Agrobacterium* (see *e.g.* Horsch *et al.*, 1985). *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes* are plant pathogenic soil bacteria that genetically transform plant cells. The Ti and Ri plasmids of *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes*,

respectively, carry genes responsible for genetic transformation of the plant (see *e.g.* Kado, 1991). Methods of introducing expression vectors into plant tissue include the direct infection or co-cultivation of plant cells with *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch *et al.*, 1985). Descriptions of *Agrobacterium* vectors systems and methods for *Agrobacterium*-mediated gene transfer provided by Gruber and Crosby, 1993 and Moloney *et al.*, 1989. See also, U. S. Pat. No. 5,591,616. General descriptions of plant expression vectors and reporter genes and transformation protocols and descriptions of *Agrobacterium* vector systems and methods for *Agrobacterium*-mediated gene transfer can be found in Gruber and Crosby, 1993. General methods of culturing plant tissues are provided for example by Miki *et al.*, 1993 and by Phillips, *et al.*, 1988. A proper reference handbook for molecular cloning techniques and suitable expression vectors is Sambrook and Russell (2001).

Another method for introducing an expression vector into a plant is based on microprojectile-mediated transformation wherein DNA is carried on the surface of microprojectiles. The expression vector is introduced into plant tissues with a biolistic device that accelerates the microprojectiles to speeds of 300 to 600 m/s which is sufficient to penetrate plant cell walls and membranes (See, Sanford *et al.*, 1987, 1993; Sanford, 1988, 1990; Klein *et al.*, 1988, 1992). Another method for introducing DNA to plants is via the sonication of target cells (see Zhang *et al.*, 1991). Alternatively, liposome or spheroplast fusion has been used to introduce expression vectors into plants (see *e.g.* Deshayes *et al.*, 1985 and Christou *et al.*, 1987). Direct uptake of DNA into protoplasts using CaCl_2 precipitation, polyvinyl alcohol or poly-L-ornithine has also been reported (see *e.g.*, Hain *et al.* 1985 and Draper *et al.*, 1982). Electroporation of protoplasts and whole cells and tissues has also been described (D'Halluin *et al.*, 1992 and Laursen *et al.*, 1994).

Following transformation of tomato target tissues, expression of the above described selectable marker genes allows for preferential selection of transformed cells, tissues and/or plants, using regeneration and selection methods now well known in the art. The markers as defined herein may also be used for that purpose.

Production of ToTV-resistant tomato plants by non-transgenic methods

In an alternative embodiment for producing a ToTV-resistant tomato plant, protoplast fusion can be used for the transfer of nucleic acids from a donor plant to a

recipient plant. Protoplast fusion is an induced or spontaneous union, such as a somatic hybridization, between two or more protoplasts (cells of which the cell walls are removed by enzymatic treatment) to produce a single bi- or multi-nucleate cell. The fused cell, that may even be obtained with plant species that cannot be crossed in nature, is tissue cultured into a hybrid plant exhibiting the desirable combination of traits. More specifically, a first protoplast can be obtained from a tomato plant or other plant line that exhibits resistance to infection by ToTV. For example, a protoplast from any of the resistant lines as indicated in the Example can be used. A second protoplast can be obtained from a second tomato or other plant variety, preferably a tomato line that comprises commercially desirable characteristics, such as, but not limited to disease resistance, insect resistance, valuable fruit characteristics, etc. The protoplasts are then fused using traditional protoplast fusion procedures, which are known in the art.

Alternatively, embryo rescue may be employed in the transfer of a resistance gene from a donor plant to a recipient plant. Embryo rescue can be used as a procedure to isolate embryo's from crosses wherein plants fail to produce viable seed. In this process, the fertilized ovary or immature seed of a plant is tissue cultured to create new plants (Pierik, 1999).

The present invention also relates to a method of producing a ToTV-resistant tomato plant comprising the steps of performing a method for detecting the presence of an allele associated with resistance to ToTV in a donor tomato plant according to invention as described above, and transferring a nucleic acid sequence comprising said allele thus detected, from said donor plant to a ToTV-susceptible recipient tomato plant. The transfer of said nucleic acid sequence may be performed by any of the methods previously described herein.

A preferred embodiment of such a method comprises the transfer by introgression of said nucleic acid sequence from a ToTV-resistant donor tomato plant into a ToTV-susceptible recipient tomato plant by crossing said plants. This transfer may thus suitably be accomplished by using traditional breeding techniques. The ToTV resistance genes are preferably introgressed into commercial tomato varieties by using marker-assisted breeding (MAS). Marker-assisted breeding or marker-assisted selection involves the use of one or more of the molecular markers for the identification and selection of those offspring plants that contain one or more of the

genes that encode for the desired trait. In the present instance, such identification and selection is preferably based on selection of markers associated with the resistance gene as identified herein.

5 ToTV-resistant tomato plants and seeds

A ToTV-resistant tomato plant, or a part thereof, obtainable by a method of the invention is also an aspect of the present invention.

The ToTV-resistant tomato plants of the present invention can be of any genetic type such as inbred, hybrid, haploid, dihaploid, parthenocarp or transgenic.

10 Further, the plants of the present invention may be heterozygous or homozygous for the resistance trait, preferably homozygous. Although the allele identified in the present invention, may be transferred to any plant in order to provide for a ToTV-resistant plant, the methods and plants of the invention are preferably related to plants of the *Solanaceae* family, more preferably tomato.

15 Inbred ToTV-resistant tomato plant lines can be developed using the techniques of recurrent selection and backcrossing, selfing and/or dihaploids or any other technique used to make parental lines. In a method of selection and backcrossing, ToTV-resistance can be introgressed into a target recipient plant (which is called the recurrent parent) by crossing the recurrent parent with a first donor
20 plant (which is different from the recurrent parent and referred to herein as the "non-recurrent parent"). The recurrent parent is a plant that is non-resistant or has a low level of resistance to ToTV and possesses commercially desirable characteristics, such as, but not limited to disease resistance, insect resistance, valuable fruit characteristics, etc. The non-recurrent parent exhibits ToTV resistance and comprises
25 a nucleic acid sequence that encodes for ToTV resistance. The non-recurrent parent can be any plant variety or inbred line that is cross-fertile with the recurrent parent. The progeny resulting from a cross between the recurrent parent and non-recurrent parent are backcrossed to the recurrent parent. The resulting plant population is then screened. The population can be screened in a number of different ways. For instance,
30 the population can be screened using a resistance bioassays or field screen as described previously herein. F₁ hybrid plants that exhibit a ToTV-resistant phenotype comprise the requisite nucleic acid sequence encoding for ToTV resistance, and possess commercially desirable characteristics, are then selected and selfed and

selected for a number of generations (up to 5, 6, 7 or 8 generations) in order to allow for the tomato plant to become increasingly inbred. This process of continued selfing and selection can be performed for two to five or more generations. The result of such breeding and selection is the production of lines that are genetically homogenous for the genes associated with ToTV resistance as well as other genes associated with traits of commercial interest. In stead of using phenotypic pathology screens of bioassays, MAS can be performed using one or more of the hereinbefore described molecular markers, hybridization probes or polynucleotides to identify those progeny that comprise a nucleic acid sequence encoding for ToTV-resistance. Alternatively, MAS can be used to confirm the results obtained from the quantitative bioassays. Once the appropriate selections are made, the process is repeated. The process of backcrossing to the recurrent parent and selecting for ToTV-resistance is repeated for approximately five or more generations. The progeny resulting from this process are heterozygous for one or more genes that encode for ToTV-resistance. The last backcross generation is then selfed in order to provide for homozygous pure breeding progeny for ToTV-resistance.

The ToTV-resistant inbred tomato lines described herein can be used in additional crossings to create ToTV-resistant hybrid plants. For example, a first ToTV-resistant inbred tomato plant of the invention can be crossed with a second inbred tomato plant possessing commercially desirable traits such as, but not limited to, disease resistance, insect resistance, desirable fruit characteristics, etc. This second inbred tomato line may or may not be ToTV-resistant, but preferably has at least one allele for ToTV resistance as linked to the markers defined herein so that at least 50% of the offspring plants express the ToTV resistant phenotype. More preferably, the second inbred tomato line is also ToTV resistant, so that the resistant phenotype is conserved despite the crossings. In this way, the a first ToTV-resistant inbred tomato plant of the invention can be used to introgress an additional heritable trait into the second inbred tomato plant line.

Another aspect of the present invention relates to a method of producing seeds that can be grown into ToTV-resistant tomato plants. In one embodiment, the method comprises the steps of providing a ToTV-resistant tomato plant of the invention, crossing said ToTV-resistant plant with another ToTV-resistant tomato plant, and

collecting seeds resulting from said cross, which when planted, produce ToTV-resistant hybrid tomato plants.

In another embodiment, the method comprises the steps of providing a ToTV-resistant tomato plant of the invention, crossing said ToTV-resistant plant with a
5 *Solanum lycopersicum* plant, collecting seeds resulting from said cross, regenerating said seeds into plants, selecting ToTV-resistant plants by any of the methods described herein, self-crossing the selected plants for a sufficient number of generations to obtain plants that are fixed for an allele that confers ToTV-resistance in the plants, backcrossing the plants thus produced with *S. lycopersicum* plants
10 having desirable phenotypic traits for a sufficient number of generations to obtain *S. lycopersicum* plants that are ToTV-resistant and have desirable phenotypic traits, and collecting the seeds produced from the plants resulting from the last backcross, which when planted, produce tomato plants which are ToTV-resistant.

By way of example, and not of limitation, Examples of the present invention
15 will now be given.

EXAMPLE

Example 1

20 Identification of markers linked to the ToTV resistance gene in tomato

The aim of this experiment was to identify AFLP markers linked to ToTV resistance in tomato, by use of a Bulk Segregant Analysis (BSA; Michelmore, R. W., I. Paran and R.V. Kesseli, 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9828-9832).

ToTV resistance was found to be a monogenic recessively inherited trait. The
25 analysis was carried out on 150 plants of a F2 tomato cultivar cross of which the F3 plants were phenotyped. For determination of a reliable phenotype, phenotyping on F3 plants was repeated several times for a subset of F2 plants. Based on the results obtained by repeated phenotyping, 18 individuals were indicated as being reliable resistant and nine plants were indicated as being reliable susceptible. These plants
30 were used for the BSA. The phenotypic information from these individuals is listed in table 1.

Marker identification and verification

Marker nomenclature

Codes by which the AFLP primer combination is commonly indicated, e.g. P14/M49-F-282, wherein P and M are the common *Pst*I and *Mse*I primer sequences or universal primers (Vos *et al.*, 1995; Bai *et al.*, 2003) followed by 2 or 3 extra selective
5 bases as indicated by a two digit extension code. Two digit extension codes are as follows: 11: AA; 13: AG; 14: AT; 15: CA; 21: GG; 25: TG; 35: ACA; 38: ACT; 49: CAG; 51: CCA; 61: CTG. 282 is the approximated size in basepairs of the resulting polymorphic fragment (given size $\pm$ 2 basepairs). The size is normally rounded off but may also be given in decimals. This fragment was amplified in the plants
10 investigated. Primer and adapter sequences are described in detail by Bai *et al.* 2003.

Marker TG163 (Expen 2000; SOL Genomics Network;
<http://www.sgn.cornell.edu/index.pl>) consists of a forward and reverse primer of the following sequence:

15 Forward sequence:
TCTGGGATCATATATGGGATCTTAGAATGCTGAAGTTTCCAAGTCCTTGATCTCCCTGGACATACTCACTGGTAATACTCTGTGGCAATAA
TGAAGCTGCTTGGCATCTCTTTAATTAAGTTGAGTTTGTATATAAGATTATGTCTGGTCCTTCAATGTGTGTCTCACTATGCTGCCTAC
AACTTAATGACTGCTAACTTTTTTTGTTAGGGTTTAGGGTTAGAAGTTTCTTTCTGGATTACCATTTCTTATTGAGTAAATGCAGTTGA
20 TGTTTGTTCCGACGACATGGACTGTCAAAGTGCAATCCGAAACATGAAGACTTAATTCTGGTTCTTTCTCTTCATTTCCTTTATCTGTTTG
TCTACCTATGTATCTGGAAAACATACCTTGTCACACTCTCACTGAGCC

Reverse sequence:
CTTAGAAGCTTCCGATGAAAAATGAACTGCAACGTCATACTAGATAAAATTAAGAGACCTCTTGCAAAATTCTACATTCCACCTCAGC
25 AGCGTTAACTCCATCATGAACACATCAAGAATACAGATTTGGAGGGGGATATACTGGAGTGATACAAACATTATAAAAGAGATGAGTAG
TGTGGCAAGGGATAATGAGCTCAAAAGATGGATCAGAGTTTCACTTACTTCGAGTTGTACTGATTATTTCTTGGAAGATGAGGCT
TGATTGATTCTACAACACCTGTTAGGAAAAAAATGCTAAATTAACATGAAAAACAGTGGTGCCAAATTCCTCAACTTAAATAAGACA
ACTCTATTAGACTATTCATCATGTATTAGAAATAATAGCAAATTGCCAAGAATACATGCACACTCATGGGAACATTTCTATGTTATCCT
GAAATTGGCTCAGAAGTCCAACACAAGAAAAGACACAGATG

30 Biological material

Leaf material of a total number of 300 F2 plants was available for evaluation. Of these, a total number of 150 plants were phenotyped based on the phenotype of the F3 plants derived from these F2 individuals. Genomic DNA was isolated from leaf material of these 150 phenotyped plants (Table 1) and *Pst*I/*Mse*I templates for AFLP
35 fingerprinting were generated from these DNA samples. Subsequently, a test fingerprint was generated by the use of primer combination P14/M50 on all plants.

BSA and verification on individuals

33

The BSA was started by screening 96 primer combinations on one bulk containing ten (10) individuals which are resistant to ToTV and one bulk containing nine (9) individuals which are susceptible to ToTV (Table 2). This screening resulted in the identification of three (3) candidate markers (P11/M54-F-233/235 (bi-allelic),
5 P14/M49-F-282 and P15/M49-F-330) which were subsequently verified on 32 individuals, consisting of a total of eighteen (18) available ToTV resistant individuals, nine (9) ToTV susceptible individuals and five (5) individuals of which the phenotype could not be assessed unambiguously (Table 3). Based on this screening, marker P14/M49-F-282 appeared to be the most closely linked marker to the ToTV resistance
10 gene.

A second BSA was performed in which 96 primer combinations were screened on the R-bulk and S-bulk (now consisting of nine and eight individuals, respectively). This screening resulted in the identification of two candidate markers (P21/M61-F-583 and P25/M51-F-131) which together with one marker from the previous BSA
15 screening (P15/M49-F-330) were verified on the 32 aforementioned individuals (Table 3). None of the additional screened markers appeared to be closer linked than the best linked marker P14/M49-F-282, identified in the first round of BSA.

Since marker P14/M49-F-282 appeared to be the most closely linked marker, it was decided to screen this marker on all 150 phenotyped individuals. The results are
20 presented in Table 5. A total of 17 recombinants were identified (Table 4). The phenotypes were divided into three classes:

- resistant (A) = Overall infection rate is less than 25%
- segregating (H) = Overall infection rate is between 25% and 75%
- susceptible (B) = Overall infection rate is above 75%

25 Based on this classification in combination with the genotypes of marker P14/M49-F-282, a total of 28 recombinants were identified, which corresponds to a distance between the marker and the ToTV resistance gene of roughly 9.5 cM. This is in accordance with the calculated size of the window (9 cM), in which the ToTV
30 resistance gene is located between marker P14/M49-F-282 and P11/M35-F-216 (Table 3). This calculation is based on the lines used for BSA and which were believed to be phenotyped most reliable.

Since marker P14/M49-F-282, which appeared to be the most closely linked of all markers tested, was still quite a large distance from the locus, markers that were linked more closely were desired. Therefore a third BSA screening was performed, in which 72 primer combinations were screened, bringing to total number of screened primer combinations to 263. In this third screening, nine candidate markers (in six primer combinations) were identified, which were verified on eight resistant and eight susceptible individuals (Table 3). Two markers (P11/M35-F-216 and the bi-allelic marker P13/M38-F-311/313) appeared to be the most closely linked. It should be stressed that the position of marker P11/M35-216 is tentative at present, as its position is based on a single recombinant. The two markers P11/M35-F-216 and P13/M38-F-311/313 were subsequently screened on a larger set of individuals of which no phenotypic information was available, including 17 recombinants and 28 resistant and susceptible individuals (Table 5).

- 15 Marker P13/M38-F-311 is linked to the sensitive allele. The 311-basepairs fragment that is amplified between the primers has the following sequence (278 of 311 bases have been determined reliably):

AGCTCTTGCAAGTTGTTTCATCTTCTTTCAGTTGTGATTCACTATCTGCCAAAAATC
AAAGAAAAGGAATAATTAGAAAATCAAGCAAATATAGTTTTGGTCAAGCAAATAA
20 ACAAGTATGGCTGGTTCTCAAAAATTGTCAAAGCTAACTAATAAAAAGAAGCCA
GATTCCTCATAGAATGAAAAGTATTTCTATAGAACAACGCGCAATACCATGGATG
AGCTAAATACACATACATGAAAGTACTCAGTAGCCTTGAACACATATGATGGGAA
GT

- 25 Marker P13/M38-F-313 is linked to the resistant allele. The 313-basepairs fragment that is amplified between the primers has the following sequence (284 of 313 bases have been determined reliably):

AGCTCTTGCAAGTTGTTTCATCTTCTTTCAGTTGTGATTCACTATCTGCCAAAAATC
30 AAAGGAAAGGAATAATTAGAAAATCAAGCAAATATAGTTTTGGTCAAGCAAATAA
ACAAGTATGGCTGGTTCTCAAAAATTGTCAAAGCTAACTAATAAAAAGAAGCTA
GATTCCTCATAGAATGAAAAGTATTTCTATAGAACAACGCGCTATACCATGGATG

AGCTAAACTACACATACATGAAAGTACTCAGTAGCCTTGAACACATATGATGGGA
AGTTTACT

Marker P11/M35-F-216 is linked to the resistant phenotype. The 216-basepairs
5 fragment that is amplified between the primers has the following sequence (185 of
216 bases have been determine reliably)
AATGAGGGAACATTCTTTTGGGCAAAGTGGCATTCTTGATAATCTTCTCACATT
CAAGAATGGTATATAACTCTTTATGACTTCACAAATATCAACTGATCCATTTTGGGA
CTGCAAAATTTGTGAACTTCTTTTCCTCTGCCATAATTAGTAAATTATATTACCAA
10 ACAATAAAATTGTTTACT

Screening two candidate linked markers on germplasm lines

The two markers P11/M35-F-216 and P13/M38-F-311/313 were identified
as being closely linked to the ToTV resistance. It should be noted that the distance
15 between gene and marker is difficult to determine, since interpretation of the
phenotypes has a large influence on the calculated distance. These markers were
screened on a germplasm set of 83 individuals. Based on this screening, marker
P11/M35-F-216 appears to have a predictive value of 90.4% and marker P13/M38-F-
311/ 313 appears to have a predictive value of 96.4% (Table 6).

20

Positioning of ToTV resistance on the tomato genome

Experimental evidence in combination with proprietary genome maps of
tomato markers suggested that marker P14/M49-F-282 was located on chromosome 4.
Therefore, it is expected that the genetic basis of ToTV resistance is located on
25 chromosome 4. Two flanking markers on chromosome 4 were discovered: the bi-allelic
marker P13/M38-F-311/313 and the COSII/CAPS marker C2_At5g25900 (See
Example 2). When this COS II/CAPS marker is digested with MseI, the sensitive
(homozygous susceptible) phenotype provides two fragments of respectively 360 bp
and 260 bp, whereas the (homozygous) resistant phenotype provides two fragments of
30 respectively 420 bp and 260 bp; plants that exhibit all three fragments have both
alleles and are heterozygous (i.e. susceptible) (see Figure 2 for a representative gel
showing the digested PCR products of a test population consisting of all three types of

plants; migration is bottom to top, size markers indicate 100, 200, 300 bp etc. fragments).

The unigene sequence (ID: SGN-U228314 based on the data of 30 June 2004; 5 Unigene SGN-U332034 on 5 April 2007) for COSII/CAPS marker C2_At5g25900 in Lycopersicon is:
AAATTGGGCTGAAACTTATGGACCTATTTATTCCATCAAAACCGGCGCAAATACA
ATTGTTGTACTCAGTTCTAGTGAAGGAGGCTATGGTGACTAGATATT
CATCCATCTCAACTAGAAAGCTAACAAACGCATTGAGAATCCTTACTTGTGATAA
10 GAGTATAGTCGCGATAAGTGATTACGATGAGTTTCACAAGACAGCGAAGCGCCA
CATACTGACCAGTGTTCTAGGACCAACTGCTCAGAAACGCTTCCGTATCCACAGG
GACACCTTGGTAGAAAATGTGTCAAAGCAACTACATGATTTGGTTAGGACTGATC
CTAACGAAGCAATTAATCTAAGGAAGTCATTTTCAGTCGGAACCTTTTGGTTTAGC
ATTGAAACAAGCTTTGGG

15 Conclusion

By screening of a total of 263 PstI/MseI PCs on two bulks of resistant en susceptible individuals and subsequent verification steps, a total of four markers (one bi-allelic) appeared to be linked to ToTV resistance. The distance between the 20 markers and the ToTV resistance gene is difficult to determine, but based on the translated phenotypes and genotypes of marker P14/M49-F-282 the distance is estimated at 9.5 cM. This is in accordance with the calculated size of the window, 9 cM in which the ToTV resistance gene is located. This calculation is based on the lines which are believed to be phenotyped most reliable.

25 Markers P11/M35-F-216 and P13/M38-F-311/313 (bi-allelic) were verified on 83 germplasm individuals. Based on this screening, the markers have a predictive value of 90.4% and 96.4% respectively. The occurrence of deviating lines might be explained by allelic variation at the ToTV locus or recombination.

30 The ToTV resistance gene is most likely located on chromosome 4 as indicated by the presence of marker P14/M49-F-282 on that chromosome.

Based on the relatively high number of candidate linked markers identified by use of 263 PCs, it is likely that the ToTV resistance gene is an introgression from a wild tomato accession.

Plant nr	Experiment 1						Experiment 2						Overall % infected	stddev in %	on BSA			
	Replication 1			Replication 2			Replication 3			Replication 4								
	# infected pt	total # pt tested	# infected pt	total # pt tested	# infected pt	total # pt tested	# infected pt	total # pt tested	# infected pt	total # pt tested	# infected pt	total # pt tested						
1	7	9	7	9														
2	5	9	6	9														
3	3	9	8	9														
4	0	9	0	9			0	9	0	9	0	9	0.0	0.0	R			
5	0	9	2	9														
8	8	9	9	9	5	9	8	9	4	9	6	9	81.0	18.3	S			
10	6	9	6	9														
12	5	9	6	9														
18	1	9	0	9														
19	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0.0	0.0	R			
20	5	7	2	7														
21	9	9	9	9	7	9	7	9	6	9	9	9	84.4	14.9	S			
22	6	9	6	9														
26	1	9	0	9														
28	2	9	1	9														
29	1	9	4	7														
30	3	9	6	9														
31	6	9	7	9														
32	8	9	9	9														
33	7	9	0	9														
34	2	9	0	9														
35	5	9	4	9														
36	9	9	9	9														
37	1	9	3	9														
39	6	8	9	9	4	9	4	9	7	9	9	9	65.9	23.6	no			
40	0	8	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0.0	0.0	R			
45	8	9	9	9	6	9	8	9	6	9	6	9	80.0	18.3	S			
46	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0.0	0.0	R			
47	8	9	7	9	4	9	4	9	8	9	8	9	64.9	22.9	no			
48	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0.0	0.0	R			
60	3	9	3	9														
52	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0.0	0.0	R			
53	8	9	8	9	6	9	9	9	6	9	6	9	82.2	14.9	S			
54	2	9	0	9														
57	2	9	2	9														
58	6	9	8	9														
59	6	9	6	9														
63	8	9	6	9														
64	3	9	5	9														
66	5	9	8	9														
68	1	9	0	8														
69	1	9	0	9														
70	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0.0	0.0	R			
71	0	9	0	9														
76	1	9	0	9														
78	6	9	6	8														
79	8	9	8	9	8	9	6	8	6	9	6	9	76.5	14.6	S			
79	8	9	8	9	6	9	4	9	5	9	5	9	68.9	19.9	no			
81	8	9	5	9														
82	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0.0	0.0	R			
83	9	9	8	9	7	9	7	9	4	9	4	9	77.8	20.8	S			
84	0	8	0	9	0	9	1	9	0	9	0	9	2.3	6.0	no			
86	0	9	0	8														
87	0	9	4	9														
89	7	9	7	9	7	9	4	9	6	9	6	9	65.7	16.7	no			
90	0	8	1	9														
92	5	9	7	9														
94	7	9	6	9														
95	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0.0	0.0	R			
98	0	8	0	9														
102	0	9	0	9														
105	6	9	5	9														
108	1	9	0	9														
112	0	9	0	9														
116	3	9	9	9														
119	7	9	9	9	7	9	2	9	3	9	6	9	64.3	29	no			
120	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0.0	0	R			
121	0	9	0	9														
122	3	9	7	9														
123	0	9	0	9														
125	0	9	1	9														
126	8	9	8	9	7	9	4	8	3	9	9	9	83.6	22.1	no			
128	8	9	8	9	9	9	3	9	6	9	9	9	84.9	28.6	no			
129	6	9	3	9														
130	0	9	0	9														
131	6	9	7	9														
132	0	9	1	9														
133	0	4	0	6	0	9	0	9	0	9	0	9	0.0	0	R			
134	1	9	0	9														

Table 1. Overview of the F2 individuals and the phenotypes for *ToTV* resistance. Note, phenotypes are based on the F3 plants derived from these F2 individuals.

135	9	9	8	9	7	9	9	9	9	9	9	88.7	14.5	9			
138	0	9	0	9	0	9	0	0	0	0	9	0.0	0	R			
137	0	9	1	9													
136	0	9	1	9													
139	6	9	7	9													
140	2	9	5	9													
142	8	9	8	9													
143	3	9	6	9													
145	0	9	3	9													
146	4	9	4	9													
147	8	9	3	9													
150	3	9	2	9													
152	5	9	5	9													
153	3	9	3	9													
154	3	9	6	9													
155	3	9	2	9													
157	6	9	7	9													
160	0	9	2	9													
161	0	9	1	9													
163	1	9	0	9													
164	4	7	6	9													
165	0	9	1	9													
166	3	9	4	9													
170	3	9	4	9													
171	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	8	6.0	0.0	R			
172	8	9	5	8	9	9	8	9	7	9	9	84.1	14.2	S			
173	8	9	6	9													
174	4	9	4	9													
176	2	9	3	9													
177	5	9	4	9													
179	0	8	0	9	0	9	0	9	0	9	9	9.0	0.0	R			
181	6	9	4	9													
182	6	9	7	8	8	9	7	9	7	8	9	77.8	7.9	no			
183	2	9	6	9													
185	1	8	3	8													
188	0	9	0	8	0	9	0	9	0	9	9	0.0	0.0	R			
189	6	9	7	8													
190	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	9	0.0	0.0	R			
191	4	9	3	9													
192	6	9	6	9	6	9	6	9	5	9	9	68.8	18.3	no			
197	0	9	1	9													
198	8	9	7	9													
200	6	9	5	9													
201	6	9	3	9													
203	7	9	6	8													
205	5	9	4	9													
206	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	9	0.0	0.0	R			
207	0	9	0	9													
209	7	9	3	9													
211	4	9	4	9													
212	0	9	0	9	0	9	1	5	0	8	9	2.5	6.9	no			
213	6	9	6	8													
215	3	7	1	8													
217	0	9	0	9													
219	8	9	4	8													
221	6	9	5	8													
222	9	9	4	9	9	9	5	9	7	9	9	75.6	25.3	no			
226	1	9	2	9													
227	7	9	3	8													
259	6	9	7	9													
262	0	9	0	9	0	9	0	8	0	9	9	0.0	0.0	R			
275	5	9	8	8													
276	4	9	7	9													
283	0	9	0	8													
284	6	9	4	9													
300	0	5	2	8													
Susceptible control line (F1 from which the F3 was derived)															18 Resistant lines		
82	12	14	7	7	7	7	7	9	9	7	7	85.6	14.6		9 Susceptible lines		
82	12	14	6	14	7	7	7	9	9	9	9						
82	7	9	34	33	8	8	8	9	9	9	9						
82	5	9	6	8	9	9	9	9	9	9	9						

Table 1 - continued

Table 2 Used F2 individuals in the bulks used for the BSA

<u>Resistant pool</u>	<u>Susceptible pool</u>
004	008
019	032
040	045
046	053
049	078
070	083
082	135
095	172
136	178*
149*	

* Individuals only used in the first BSA

Individual	Overall % infected	std dev ln %	Translated phenotype KG	P11/M35-F-216<N>					P13/M38-F-311<N>					P14/M49-F-282<N>					P15/M49-F-330<N>				
				Phenotype DRS					Phenotype DRS					Phenotype DRS					Phenotype DRS				
				CIS	TRANS	CIS	TRANS	CIS	TRANS	CIS	TRANS	CIS	TRANS	CIS	TRANS	CIS	TRANS	CIS	TRANS				
T084	2.3	5.0	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T182	77.8	7.9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
T192	68.9	18.3	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T212	2.5	8.9	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T004	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T019	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T040	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T046	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T049	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T052	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T070	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T082	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T095	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T120	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T133	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T136	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T149	0.0		B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T171	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T179	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T186	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T190	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T206	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T262	0.0	0.0	B	B	R	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B				
T008	81.0	18.3	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
T021	84.4	14.9	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
T045	80.0	18.3	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
T053	82.2	14.9	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
T078	79.5	14.6	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
T083	77.8	20.8	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
T135	86.7	14.5	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
T172	84.1	14.2	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
T178	82.2	12.7	A	A	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				

Legend:

A = homozygous P1 (=susceptible)

B = homozygous P2 (=resistant)

H = Heterozygous score

D = Between A and H

C = Between B and H

U = Unknown score

R = Individual resistant

S = Individual susceptible

Translated phenotype KG:

A = Overall % infected > 75

B = Overall % infected < 25

H = 25 < Overall % infected < 75

Table 3 Overview of the markers identified by use of BSA and which are subsequently screened on 32 F2 plants. Markers are ordered on the most expected order. It is questioned whether marker P11/M35-F-216 is positioned correctly.

	Individual	Overall % Infected	stdev in %	Translated phenotype KG	P14/M49-F-282<N>				
					CIS				
Rec	T026	5.6		B	B	Legend:			
Rec	T037	22.2		A	B	A = homozygous P1 (=susceptible)			
Rec	T054	11.1		B	B	B = homozygous P2 (=resistant)			
Rec	T075	5.6		B	B	H = Heterozygous score			
Rec	T084	2.3	5.0	B	B	D = Between A and H			
Rec	T087	22.2		A	B	C = Between B and H			
Rec	T090	5.9		B	B	U = Unknown score			
Rec	T125	5.6		B	B				
Rec	T132	5.6		B	B	R = Individual resistant			
Rec	T134	5.6		B	B	S = Individual susceptible			
Rec	T137	5.6		B	B				
Rec	T138	5.6		B	B	Translated phenotype KG:			
Rec	T145	16.7		B	B	A = Overall % infected > 75			
Rec	T153	33.3		B	B	B = Overall % infected < 25			
Rec	T177	60.0		B	B	H = 25 < Overall % infected < 75			
Rec	T211	44.4		B	B				
Rec	T212	2.5	8.9	B	B	Note:			
						Rec are identified by De Ruiter Seeds			

Table 4 Recombinants selected by De Ruiter Seeds on the basis of marker P14/M49-F-282<N>.

Individual	Overall % infected	side to %	P11/M35-F-216			P13/M38-F-311/313			P14/M49-F-282			Individual	Overall % infected	side to %	P11/M35-F-216			P13/M38-F-311/313			P14/M49-F-282		
			CS	US	TS	CS	US	TS	CS	US	TS				CS	US	TS	CS	US	TS	CS	US	TS
T001	77.8		A	A	A	A	A	A	A	A	A	T131	68.7		B	B	B	B	B	B	B	B	
T002	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	U	Rec T132	5.6		B	B	B	B	B	B	B	B	
T003	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T133	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	
T004	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	B	Rec T134	5.6		B	B	B	B	B	B	B	B	
T005	11.1		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T135	85.7	14.3	A	A	A	A	A	A	A	A	
T006	61.0	10.3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T136	0.0	0.0	U	U	U	U	U	U	U	U	
T010	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	U	Rec T137	5.8		B	B	B	B	B	B	B	B	
T012	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	U	Rec T138	5.8		B	B	B	B	B	B	B	B	
T018	5.6		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T139	72.2		U	U	U	U	U	U	U	U	
T019	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	B	T140	38.9		U	U	U	U	U	U	U	U	
T020	60.0		U	U	U	U	U	U	U	U	U	Rec T142	77.8		A	A	A	A	A	A	A	A	
T021	64.4	14.9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T143	50.0		U	U	U	U	U	U	U	U	
T022	64.7		U	U	U	U	U	U	U	U	U	Rec T145	16.7		B	B	B	B	B	B	B	B	
T024	5.6		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T146	44.4		U	U	U	U	U	U	U	U	
T028	16.7		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T147	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	
T028	38.5		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T148	0.0		U	U	U	U	U	U	U	U	
T030	44.4		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T149	27.8		U	U	U	U	U	U	U	U	
T031	72.2		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T152	55.6		U	U	U	U	U	U	U	U	
T032	64.4		A	A	A	A	A	A	A	A	A	Rec T153	30.3		U	U	U	U	U	U	U	U	
T033	38.9		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T154	60.0		U	U	U	U	U	U	U	U	
T035	60.0		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T155	27.8		U	U	U	U	U	U	U	U	
T036	100.0		A	A	A	A	A	A	A	A	A	T157	72.2		U	U	U	U	U	U	U	U	
Rec T037	22.2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	T160	11.1		B	B	B	B	B	B	B	B	
T039	65.9	23.5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T161	5.6		U	U	U	U	U	U	U	U	
T040	0.0	0.0	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T163	5.6		U	U	U	U	U	U	U	U	
T045	80.0	18.3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T164	56.3		U	U	U	U	U	U	U	U	
T046	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	B	T165	5.6		B	B	B	B	B	B	B	B	
T047	68.9	22.6	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T166	38.9		U	U	U	U	U	U	U	U	
T049	0.0	0.0	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T170	38.3		U	U	U	U	U	U	U	U	
T050	33.3		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T171	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	
T052	0.0	0.0	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T172	84.1	14.2	A	A	A	A	A	A	A	A	
Rec T053	82.2	14.9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T173	77.8		U	U	U	U	U	U	U	U	
T054	11.1		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T174	44.4		U	U	U	U	U	U	U	U	
T057	22.2		U	U	U	U	U	U	U	U	U	Rec T176	38.9		U	U	U	U	U	U	U	U	
T058	72.2		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T177	50.0		A	A	A	A	A	A	A	A	
T059	66.7		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T178	82.2	12.7	A	A	A	A	A	A	A	A	
T062	85.6	14.9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T179	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	
T063	77.8		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T180	16.7		B	B	B	B	B	B	B	B	
T064	44.4		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T181	85.6		U	U	U	U	U	U	U	U	
T065	72.2		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T182	77.8	7.9	A	A	A	A	A	A	A	A	
T068	5.9		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T183	44.4		U	U	U	U	U	U	U	U	
T069	5.6		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T185	23.5		A	A	A	A	A	A	A	A	
T070	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	B	T186	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	
T071	0.0		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T189	72.2		B	B	B	B	B	B	B	B	
Rec T072	5.6		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T190	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	
T076	70.6		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T191	60.0		U	U	U	U	U	U	U	U	
T078	75.6	14.6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T192	64.9	10.3	A	A	A	A	A	A	A	A	
T079	68.9	19.8	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T194	66.7		U	U	U	U	U	U	U	U	
T081	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T197	5.6		B	B	B	B	B	B	B	B	
T082	0.0	0.0	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T198	72.2		U	U	U	U	U	U	U	U	
T083	77.8	20.8	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T200	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	
Rec T084	2.3	5.0	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T201	44.4		U	U	U	U	U	U	U	U	
T086	0.0		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T205	50.0		U	U	U	U	U	U	U	U	
Rec T087	22.2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	T208	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	
T089	66.7	15.7	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T207	0.0		B	B	B	B	B	B	B	B	
Rec T090	5.9		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T209	55.6		U	U	U	U	U	U	U	U	
T092	66.7		U	U	U	U	U	U	U	U	U	Rec T211	44.4		B	B	B	B	B	B	B	B	
T094	72.2		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T212	2.6	8.9	U	U	U	U	U	U	U	U	
T095	0.0	0.0	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T213	7		A	A	A	A	A	A	A	A	
T096	0.0		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T214	7		U	U	U	U	U	U	U	U	
T102	0.0		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T215	26.7		B	B	B	B	B	B	B	B	
T105	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T217	0.0		B	B	B	B	B	B	B	B	
T108	5.6		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T219	66.7		U	U	U	U	U	U	U	U	
T112	0.0		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T221	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	
T115	66.7		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T222	76.8	29.3	A	A	A	A	A	A	A	A	
T118	68.3	29.0	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T226	16.7		B	B	B	B	B	B	B	B	
T120	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	B	T227	55.6		U	U	U	U	U	U	U	U	
T121	0.0		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T258	66.7		U	U	U	U	U	U	U	U	
T122	55.6		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T262	0.0	0.0	B	B	B	B	B	B	B	B	
Rec T123	0.0		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T278	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	
T125	5.6		B	B	B	B	B	B	B	B	B	T276	61.1		U	U	U	U	U	U	U	U	
T126	63.6	22.1	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T283	0.0		B	B	B	B	B	B	B	B	
T128	48.8	26.6	U	U	U	U	U	U	U	U	U	T284	55.6		A	A	A	A	A	A	A	A	
T129	44.4		U	U	U	U	U	U	U	U	U	T300	14.3		U	U	U	U	U	U	U	U	
T130	0.0		U	U	U	U	U	U	U	U	U												

Table 5 Data generated by use of the three best linked markers. Marker P14/M49-F-282 is screened on 150 phenotype lines and the markers P11/M35-F-216 and the bi-allelic P13/M38-F-311/313 were screened on a subset.

P13/M38-F-313<N>				P13/M38-F-311<N>				P11/M35-F-216<N>			
Phenotype DRS				Phenotype DRS				Phenotype DRS			
CIS				CIS				CIS			
TRANS				TRANS				TRANS			
T98	136			T06PF8	B	B	B				
T578	1191			T06PF35	B	B	B				
T579	1192			T06HN28	B	B	B				
T793	1673		B	T06HN32	B	B	B				
T71	80			T06HN91	B	B	B				
T70	78			T06HN63	B	B	B				
T78	89			T06HN67	B	B	B				
T101	140			T06HN74	B	B	B				
T102	141			T06HN98	B	B	B				
T377	609			T06HT11	B	B	B				
T286	461			T06HT13	B	B	B				
T289	471			T06HT17	B	B	B				
T06PF9		B	A	T06HT18	B	B	B				
T06OV6		A	A	T06HT28	B	B	B				
T06DE83		A	A	T06HT3	B	B	B				
T06DE84		A	A	T06HT30A	B	B	B				
T06DE21		A	A	T06HT31	B	B	B				
T06DE142		A	A	T06HT38	B	B	B				
T06DE143		A	A	T06HT7	B	B	B				
T05GB1/05GB126BU		A	A	T06HT72A	B	B	B				
T05SP1		B	A	T06HT8	B	B	B				
T05SP2		B	A	T06DS1	B	B	B				
T05OT1		A	A	T06TA109	B	B	B				
T06MD44		A	A	T06TA110	B	B	B				
T06MD48		A	A	T06TA122	A	B	B				
T06MD50		A	A	T06TA117	B	B	B				
T06GL14		A	A	T06TA130	B	B	B				
T06GL15		A	A	T06TA131	B	B	B				
T06GL16		A	A	T06TA120	B	B	B				
T06GL17		A	A	T06TA42	B	B	B				
T06GL18		A	A	T06TA0169	B	B	B				
T06GL19		A	A	T06TA85	B	B	B				
T06GL20		A	A	T06TA143	B	B	A				
T06GL21		A	A	T05OT2	B	B	B				
T06GL22		A	A	T05SP10	B	B	B				
T06GL23		A	A	T05GL69	B	B	B				
T06GL24		A	A	T05GL1	B	B	B				
T46	47	B	B	T05GL93	A	B	B				
T43	44	B	B	T05GL65	B	B	B				
T663	1367	B	B	T05GL50	B	B	B				
T67	74	B	B	T05GL102	B	B	B				
T06PF1		B	B								

Table 6 Data generated by screening of two candidate linked markers to ToTV resistance on 83 germplasm lines.

Example 2

Use of marker C2_At5g25900 and restriction enzyme Mse I to detect
5 the recessive resistance for ToTV.

Sample:

A DNA sample of tomato tissue from each plant of a test population was
prepared by using standard preparation techniques (microprep, e.g. as referred to in
10 Fulton TM, Chunwongse J, and Tanksley SD. (1995) Microprep Protocol for
Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. Plant Molecular
Biology Reporter 13 (3): 207-209.).

The PCR chemicals were the following:

- 15 - dNTP's (2mM Stock) (Amersham Bioscience)
- SuperTherm polymerase (Integro)
- Forward primer (10ng/μl) 5' TGC TAA TTG GGC TGA AAC TTA TGG
- Reverse primer (10ng/μl) 5' TGT TAG CTT TCT AGT TGA GAT GGA TG
- 10xPCR buffer 25mM MgCl₂
20 - Loading buffer
- Ethidiumbromide (10mg/ml)
- 1x TE
- 0,5X TBE (Duchefa)
- Restriction enzyme Mse I (New England Biolabs)

25

The PCR mixture consisted of (per sample)

	2.0	μl 10x PCR buffer (25mM MgCl ₂)
	2.0	μl dNTP's mix (2mM of each dNTP's))
30	3.0	μl Forward primer (10 ng/μl)
	3.0	μl Reverse primer (10 ng/μl)
	0.05	μl SuperTherm polymerase
	8.95	μl H ₂ O

1.1 µl template DNA

The PCR thermocycler profile was as follows:

5 3 min. @ 94° C; (30 sec. @ 94° C, 1 min. @ 65° C, and 1 min. @ 72° C) for 32 cycles;
hold @ 4° C

The PCR products were digested with Mse I following the manufacturer's instructions. Electrophoresis was performed in 1.5% agarose gels.

10

Markerscores:

Score 1 = 360 bp + 260 bp = homozygous susceptible
Score 2 = 420 bp + 360 bp + 260 bp = heterozygous
Score 3 = 420 bp + 260 bp = homozygous resistant

15

The phenotype was independently scored from hybrids.

Results and discussion:

20 A photograph of the gel is presented in Figure 2, showing the digested PCR products of the test population consisting of all three types of plants; migration is bottom to top, size markers indicate 100, 200, 300 bp etc. fragments).

Table I:

	ToTV Markerscore	ToTV pheno
<u>2-Heterozygous</u>		
Plant 1002	2	2
Plant 1003	2	2
Plant 1004	2	2
Plant 1006	2	2
Plant 1007	2	2
Plant 1010	2	2
Plant 1011	2	2
Plant 1012	2	2
Plant 1014	2	2
Plant 1015	2	2

25

Table II:

	ToTV markerscore	ToTV Pheno
<u>3-Resistant</u>		
Plant 1016	3	3
Plant 1017	3	3
Plant 1018	3	3
Plant 1019	3	3
Plant 1037	3	3
Plant 1038	3	3
Plant 1040	3	3
Plant 1041	3	3
Plant 1042	3	3
Plant 1043	3	3
Plant 1044	3	3
Plant 1045	3	3
Plant 1046	3	3
Plant 1047	3	3
Plant 1048	3	3
Plant 1049	3	3
Plant 1051	3	3
Plant 1052	3	3
Plant 1054	3	3
Plant 1055	3	3
Plant 1061	3	3
Plant 1062	3	3
Plant 1064	3	3
Plant 1065	3	3
Plant 1066	3	3
Plant 1067	3	3
Plant 1068	3	3
Plant 1069	3	3
Plant 1070	3	3
Plant 1071	3	3
Plant 1072	3	3
Plant 1073	3	3
Plant 1074	3	3
Plant 1075	3	3
Plant 1076	3	3
Plant 1077	3	3
Plant 1078	3	3
Plant 1079	3	3
Plant 1080	3	3
Plant 1081	3	3
Plant 1082	3	3
Plant 1083	3	3
Plant 1084	3	3
Plant 1089	3	3
Plant 1090	3	3

Table III:

	ToTV markerscore	ToTV Pheno
<u>1-Susceptible</u>		
Plant 1020	1	1
Plant 1021	1	1
Plant 1022	1	1
Plant 1024	1	1
Plant 1025	1	1
Plant 1026	1	1
Plant 1027	1	1
Plant 1028	1	1
Plant 1029	1	1
Plant 1030	1	1
Plant 1031	1	1
Plant 1032	1	1
Plant 1033	1	1
Plant 1034	1	1
Plant 1035	1	1
Plant 1036	1	1
Plant 1056	1	1
Plant 1057	1	1
Plant 1058	1	1
Plant 1059	1	1
Plant 1085	1	1
Plant 1086	1	1
Plant 1087	1	1
Plant 1088	1	1
<u>1-Resistant</u>		
Plant 1039	1	3
Plant 1050	1	3
Plant 1053	1	3
<u>3-Susceptible</u>		
Plant 1023	3	1
<u>Unknown</u>		
Plant 1005	3	2?
Plant 1008	3	2?
Plant 1013	-	2

The marker C2_At5g25900 was originally tested in 86 lines. Three of these lines could not be analysed because unclear phenotype or no marker results (see “unknown” in table III).

- 10 lines give score “2” while the phenotype was heterozygous susceptible.
- 24 lines give score “1” while the phenotype was homozygous susceptible.
- 45 lines give score “3” while the phenotype was homozygous resistant.
- The markerscores coincide with the observed phenotype in 95% of the tested material.

10

Conclusions:

It was concluded that the marker can reliably (95% accuracy) be used for the prediction of the phenotype and for the detection of the resistance allele

- 15 The genetic distance between the marker C2_At5g25900 and the resistance allele was mapped partially. Based on this marker, the data were inconclusive and the distance with the gene could only be determined reliably between a range of 0 and 10 cM.

- 20 When the same samples were tested for marker P13/M38-F-311/313, a total of 2 recombinants out of 55 samples could be accounted for, representing a linkage between this marker and the resistance gene of between 0cM and 3,6cM.

25

Claims

1. A plant having within its genome at least one allele of a gene that confers resistance to Tomato torrado virus (ToTV), said virus having been deposited with the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH on 24 November 2004 under depositors reference number ToTV-E01 (DSM 16999).
- 5 2. Plant according to claim 1, wherein said plant is a plant of the genus *Solanaceae*, more preferably a tomato plant.
3. Plant according to claim 1, wherein said plant is a plant of the species
10 *Solanum lycopersicum*.
4. Plant according to claim 3, wherein said allele is located in a genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker
15 C2_At5g25900, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/ 313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900.
5. Plant according to any one of claim 4, wherein said allele is located on
20 chromosome 4, preferably in a genomic region positioned between AFLP markers P14/M49-F-282 and P11/M35-F-216, even more preferably between AFLP marker P13/M38-F-311/313 and COSII/CAPS marker C2_At5g25900.
6. Plant according to any one of claims 1-5, wherein said allele is present in
25 homozygous form.
7. Plant according to any one of claims 1-6, wherein said resistance is expressed as a resistance to the establishment of an infection.

8. Plant according to any one of claims 1-7, wherein said plant is identified in a resistance bioassay involving infection with the Tomato torrado virus (ToTV) as defined in claim 1, optionally followed by a method involving screening for the presence of at least one molecular marker linked to said allele of said ToTV resistance gene.
9. Plant according to any one of claims 1-8, wherein said plant is produced by a method involving screening for the presence of at least one molecular marker linked to said allele of said ToTV resistance gene, optionally followed by a resistance bioassay involving infection with the Tomato torrado virus (ToTV) as defined in claim 1.
10. Plant according to claim 9, wherein said at least one molecular marker is selected from the group consisting of AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, and P13/M38-F-311/313 and COSII/CAPS marker C2_At5g25900, preferably from the group consisting of AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and P13/M38-F-311/313 and COSII/CAPS marker C2_At5g25900, most preferably from the group consisting of AFLP markers P11/M35-F-216 and P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900.
11. A plant part derived from a plant according to any one of claims 1-10.
12. Plant part according to claim 10, wherein said part is a fruit or seed.
13. Method for selecting a plant that is resistant to the Tomato torrado virus (ToTV) as defined in claim 1, said method comprising the steps of:
- providing an inoculum of said virus;
 - exposing a plant to said inoculum;
 - allowing for a sufficient incubation time, and
 - selecting said plant in case no infection establishes in said plant upon lapse of said incubation time.

14. Method for selecting a plant having within its genome at least one allele of a gene that confers resistance to the Tomato torrado virus (ToTV) as defined in claim 1, said method comprising the step of screening the genomic DNA of a plant for the presence of a genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, and/or P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900.
15. Method for the production of a plant comprising selecting a plant having within its genome at least one allele of a gene that confers resistance to the Tomato torrado virus (ToTV) as defined in claim 1 by performing the method of claim 13 or 14 and crossing said selected plant with itself or another plant to produce seed, and growing said seed into a plant.
16. Method for the production of a plant that is resistant to the Tomato torrado virus (ToTV) as defined in claim 1, said method comprising the step of:
- a) selecting a plant having within its genome at least one allele of a gene that confers resistance to said Tomato torrado virus (ToTV) by performing the method of claim 13 or 14;
 - b) crossing said selected plant with another plant or with itself to produce seed;
 - c) growing said seed into plants to produce offspring plants;
 - d) optionally repeating the crossing and growing steps of steps b) and c), and
 - e) selecting from amongst the offspring plants a plant wherein said allele is present in homozygous form.
17. Method according to claim 16, wherein said selection in step e) is performed by screening the DNA of said offspring plant for the homozygous presence of said genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, and/or P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282,

P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker

C2_At5g25900, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900.

- 5 18. Method according to claim 16, wherein said selection in step e) is performed by a resistance bioassay using said virus.
19. Method according to any one of claims 13-18, wherein said plant is a plant of the genus Solanaceae, more preferably a tomato plant, still more preferably a plant
10 of the species *Solanum lycopersicum*.
20. Plant obtainable by the method according to any one of claims 13-20.
21. Plant according to claim 20, wherein said plant is a plant of the genus
15 Solanaceae, more preferably a tomato plant, still more preferably a plant of the species *Solanum lycopersicum*
22. A plant part derived from a plant according to claim 21.
- 20 23. Plant part according to claim 22, wherein said part is a fruit or seed.
24. Use of the allele that confers resistance against ToTV, which allele is located in a genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 and/or
25 COSII/CAPS marker C2_At5g25900, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/ 313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900 on chromosome 4 of tomato:
 - to select ToTV resistant tomato plants, or
 - 30 - to confer resistance to ToTV in a ToTV susceptible tomato variety by increasing the frequency of the presence of the resistant allele in said variety.

25. Use of a ToTV resistant plant for enhancing the yield of and/or for preventing yield loss in said plant resulting from ToTV infection, wherein said ToTV resistant plant is characterized by the homozygous presence of the allele located in a genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/ 313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900 on chromosome 4 of tomato.
- 10 26. Use of a seed of a ToTV resistant plant, wherein said plant is defined in any one of claims 1-11, 20 or 21, for producing a ToTV resistant plant or for preventing the occurrence of torrado disease (or a related disease such as marchitez or chocolate spot disease) in a plant or in a population of plants.
- 15 27. Use of a plant comprising at least one allele that confers resistance to ToTV, or that is homozygous for an allele that confers resistance to ToTV, wherein said allele is located in a genomic region linked to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900, preferably to AFLP markers P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/313, most preferably to AFLP markers P11/M35-F-216 and/or P13/M38-F-311/ 313 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900 on chromosome 4 of tomato, as a ToTV resistant tomato plant or as a parent plant in breeding programs aimed at providing other plants with the ToTV resistant phenotype that results from the homozygous presence of said allele.
- 20 28. Use of AFLP markers P13/M38-F-311/313, P11/M35-F-216 and/or COSII/CAPS marker C2_At5g25900 for detecting the presence of an allele that confers resistance to ToTV in a plant.
- 30 29. Use according to any one of claims 24-28, wherein said plant is a tomato plant.

Figure 1

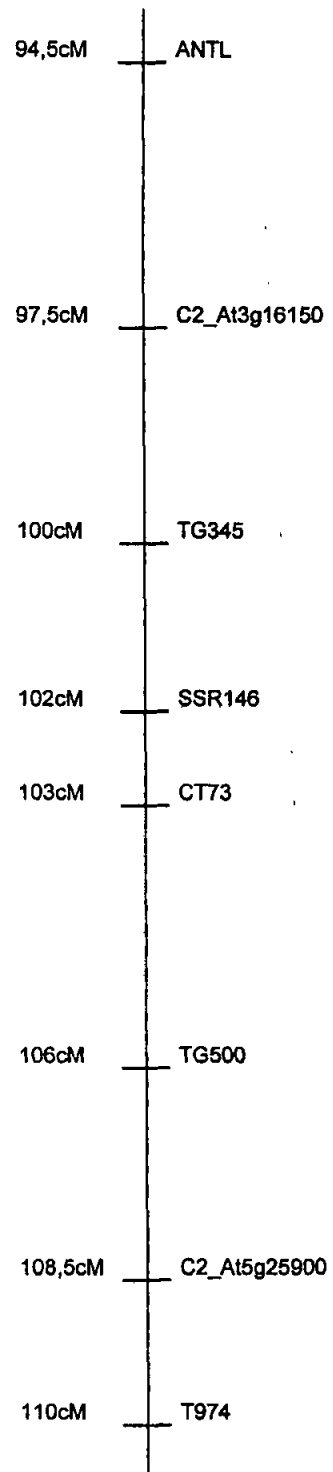
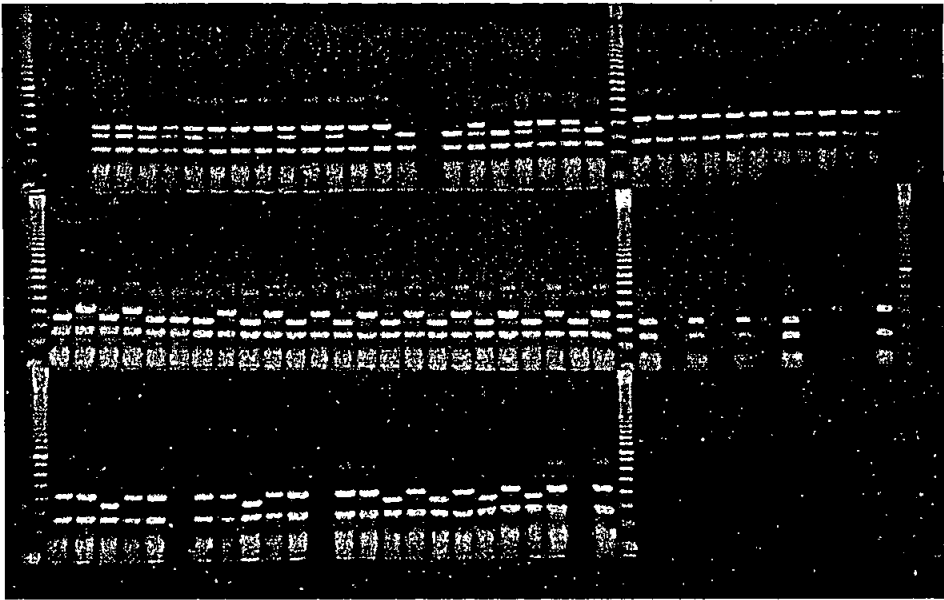


Figure 2



Plantas To-TV resistentes

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a plantas resistentes al virus y a los métodos para producir tales plantas. En particular, el método se refiere a las plantas que son resistentes al virus de Tomate torrado (ToTV), a los métodos de producir dichas plantas y a plantas y partes de planta así obtenidas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El tomate *Solanum lycopersicum* (anteriormente *Lycopersicon esculentum*) es susceptible a un gran número de especie viral. Algunos de los virus de tomate más importantes incluyen el virus de Tomate de marchitamiento manchado (TSWV; género *Tospovirus*); virus mosaico de Pepino (PepMV; género *Potexvirus*), y el virus de Tomate de hoja amarilla rizada (TYLCV; género *Begomovirus*). El daño que estas enfermedades infligen a la gama de planta van desde la decoloración de las hojas y lesiones necróticas, a la pérdida severa de la cosecha y la muerte de la planta.

La capacidad de proporcionar plantas resistentes tiene una importancia extrema en cultivadores comerciales, y se han producido variedades de planta resistentes para algunos virus económicamente más perjudiciales. Sin embargo, de vez en cuando, aparecen nuevos virus que pueden infligir daños considerables a las cosechas.

En 1996 se encontró un nuevo virus de tomate que había infectado plantas de tomate en EE. UU e Italia desde 1993, y era el virus de Tomate llamado de clorosis infeccioso (TICV; género *Crinivirus*; Duffus *et al.*, 1996). Otro nuevo virus de tomate del mismo género se descubrió en 1998. Dicho virus se manifestó al haber infectado plantas de tomate en EE. UU desde 1989 y era el virus de clorosis de Tomate llamado (ToCV; Wisler *et al.*, 1998). Ambos nuevos virus demostraron estar extendidos por una mosca blanca, un insecto que muestra tener un vector de transmisión de enfermedad muy eficaz.

Generalmente se cree que la distribución geográfica de virus conocidos aumentará y que nuevos virus seguirán apareciendo, en parte como consecuencia de la nueva combinación de diferentes virus para formar nuevas cepas o nuevos virus.

El desarrollo de cultivos resistentes puede jugar un papel importante en la dirección acertada de estas enfermedades.

Recientemente, se descubrió un nuevo virus sobre plantas de tomate en España, que causó síntomas (localmente conocidos en la zona como la enfermedad "torrado") que no podían ser atribuidos a ningún virus conocido. Las plantas mostraron lesiones necróticas sobre hojas y anillos marrones sobre frutas y mostraron un crecimiento reducido. Pruebas serológicas (ELISA) indicaron la presencia de *virus mosaico de Pepino* (PepMV). Investigaciones microscópicas de electrones revelaron partículas parecidas a una barra típicas de potexvirus. Sin embargo, se encontraron también partículas virales esféricamente formadas de tejido de hoja infectado. Los inventores fueron capaces de separar el nuevo virus del complejo de PepMV. El nuevo virus fue provisionalmente llamado virus de Tomate torrado (ToTV), y fue solicitado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004 bajo el número de referencia de solicitante ToTV-E01 (DSM 16999), y es el agente causante de enfermedades que afectan el tomate conocido como "torrado" (España), "marchitez" o "chocolate" (Méjico y Guatemala). Se cree que el virus es también capaz de causar los síntomas de enfermedad que son similares a aquellos causados en el tomate en otros géneros de *Solanum*, notablemente en *Capsicum* spp. (Pimienta) y *Solanum melongena* (Berenjena).

Actualmente no hay ningunas plantas conocidas que abrigan resistencia específica a este nuevo virus, mientras que hay una necesidad de desarrollar tales plantas resistentes.

25 RESUMEN DE LA INVENCION

Los inventores presentes han descubierto ahora las plantas de tomate que son resistentes a ToTV. Ellos detectaron que, sobre la exposición de las plantas al virus, los síntomas de enfermedad permanecieron ausentes, y que partículas virales, o viral ARN no podían ser descubiertos en estas plantas. Como se indica debajo, esta respuesta es definida como resistente. Dichas plantas tienen una importancia fundamental en el desarrollo de las variedades comercialmente valiosas de tomate cultivado que son resistentes al nuevo virus, especialmente cuando los elementos

genéticos responsables o asociados con el rasgo de resistencia, e intercambiados entre plantas durante el cruce, pueden ser seguidos y supervisados durante el proceso de cultivo. Tal supervisión ayuda a mejorar la eficacia de cultivo y puede mejorar enormemente el tiempo-al-mercado para variedades resistentes recién desarrolladas.

5 A partir de experimentos de cruces, se descubrió que el gen responsable de la resistencia a ToTV estaba presente homocigóticamente en las plantas resistentes mientras plantas heterocigotos eran susceptibles a la infección ToTV. Así, se descubrió que la resistencia ToTV es conferida por un gen recesivo. De todos modos las plantas que contienen ambas formas del alelo, p. ej. plantas heterocigotos, son

10 igualmente útiles para cultivadores de planta ya que pueden ser usadas como padres en cruces y en autofecundaciones para producir plantas de descendiente homocigoto.

En un primer aspecto, por lo tanto, la invención presente se refiere a una planta de tomate que tiene dentro de su genoma al menos un alelo de un gen que confiere la resistencia al virus de Tomate torrado (ToTV), dicho virus habiendo sido

15 solicitado al Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004 bajo el número de referencia de solicitantes ToTV-E01 (DSM 16999). La plantas de tomate ToTV resistentes eran hasta ahora desconocidas.

Sobre la experimentación subsecuente, los inventores encontraron que la resistencia en estas plantas de tomate ToTV resistentes estaba estrechamente unida

20 a un número de marcadores AFLP. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, y a pesar del hecho que la posición de la mayor parte de estos marcadores sobre el genoma debe aún ser determinada, se cree que el(los) gen (s) responsable(s) del rasgo está(n) localizados sobre el cromosoma 4. Por lo tanto, en un modo preferido del primer dicho aspecto, el alelo que comprende un gen que confiere la resistencia al

25 virus de Tomate torrado (ToTV) está localizado en una región genómica vinculada a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, y/o P13/M38-F-311/313, preferentemente a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313, más preferentemente a marcadores AFLP P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313.

30 En un modo preferido del primer dicho aspecto, dicho alelo está localizado sobre el cromosoma 4, preferentemente en una región genómica colocada entre marcadores AFLP P14/M49-F-282 y P11/M35-F-216.

En otro modo preferido del primer dicho aspecto, dicho alelo está presente en forma de homocigoto, lo que significa en la planta expresar el fenotipo resistente.

En todavía otro modo preferido del primer dicho aspecto, dicha planta de tomate es una planta de la especie *Solanum lycopersicum*, preferentemente una
5 planta de tomate cultivada.

En aún otro modo preferido del primer dicho aspecto, dicha resistencia es expresada como una resistencia al establecimiento de una infección con ToTV sobre la exposición de dicha planta a al menos la dosificación mínima infecciosa del virus. La persona experta entenderá que la dosificación mínima eficaz puede ser
10 determinada por la experimentación rutinaria sobre plantas susceptibles.

En aún otro modo preferido del primer dicho aspecto, dicha planta es identificada en una resistencia bioensayo implicando la infección con ToTV, o en la que dicha planta es identificada examinando la presencia de al menos un marcador molecular vinculado a dicho alelo de dicho gen de resistencia ToTV.

15 En aún otro modo preferido del primer dicho aspecto, dicha planta es producida por una selección de implicación de método para la presencia de al menos un marcador molecular vinculado a dicho alelo de dicho gen de resistencia ToTV.

En un remoto aspecto, la invención presente se refiere a una parte de planta extraída de una planta de la invención presente. Los ejemplos de partes de planta
20 incluyen, pero no están limitados a, células únicas y tejidos de polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíz, anteras, flores, frutas, brotes de tallos, y semillas; así como el polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíz, anteras, flores, frutas, tallos, brotes, vástagos, rizomas, semillas, protoplastos, calli, y otros por el estilo. Dicha parte preferentemente es una fruta o una semilla. Otros modos
25 preferidos de partes de planta incluyen partes para la propagación vegetativa incluyendo dichas partes preferidas como microesporas, polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíz, anteras, flores, frutas, , brotes de tallos, tallos, brotes, vástagos, rizomas, protoplastos, calli, y tejido meristémico y otros por el estilo.

30 En un remoto aspecto, la invención presente se refiere a un método para seleccionar una planta de tomate que es resistente al virus de Tomate torrado (ToTV) como se define aquí, dicho método comprende los pasos de :

- a) suministro de una inoculación de dicho virus;
 - b) exposición de una planta de tomate a dicha inoculación;
 - c) tener en cuenta un tiempo de incubación suficiente,
 - d) seleccionar dicha planta de tomate en caso de que ninguna infección se
- 5 establezca en la dicha planta durante dicho lapso de tiempo de incubación.

En un remoto aspecto, la invención presente se refiere a un método para seleccionar una planta de tomate teniendo dentro de su genoma al menos un alelo de un gen que confiere la resistencia al virus de Tomate torrado (ToTV) como se define aquí, dicho método comprende el paso de proteger el ADN genómico de una planta de

10 tomate para la presencia de una región genómica vinculada a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, y/o P13/M38-F-311/313, preferentemente a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313, más preferentemente a marcadores AFLP P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313.

15 En todavía un remoto aspecto, la invención presente se refiere a un método para la producción de una planta de tomate que comprende seleccionar una planta que tenga dentro de su genoma al menos un alelo (de un gen) que confiera resistencia al virus de Tomate torrado (ToTV) como se define aquí realizando un método para seleccionar una planta de tomate según la invención presente y cruzarse dicha

20 planta seleccionada consigo u otra planta de tomate para producir la semilla, y crecer dicha semilla en una planta de tomate.

En todavía un remoto aspecto, la invención presente se refiere a un método para la producción de una planta de tomate que es resistente al virus de Tomate torrado (ToTV) como se define aquí, dicho método comprende el paso de :

- 25 a) seleccionar una planta teniendo dentro de su genoma al menos un alelo de un gen que confiere la resistencia al dicho virus de Tomate torrado (ToTV) realizando un método para seleccionar una planta de tomate según la invención presente;
- b) cruzar dicha planta seleccionada con otra planta de tomate o consigo
- 30 para producir semilla;
- c) crecer dicha semilla en plantas de tomate para producir plantas descendientes;

d) opcionalmente repetir el cruce y los pasos de crecimiento de los pasos b) y c),

e) seleccionar de entre el descendiente de planta una planta en la que dicho alelo está presente en la forma de homocigoto.

5 En un modo preferido de dicho método, la selección en el paso e) se realiza examinando el ADN de dicha planta descendiente de la presencia homocigoto de dicha región genómica vinculada a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, y/o P13/M38-F-311/313, preferentemente a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 y/o P13/M38-
10 F-311/313, más preferentemente a marcadores AFLP P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313. O bien, la selección en el paso e) se realiza por una resistencia bioensayo utilizando dicho virus ToTV o cualquier otro método conveniente como se describe aquí.

15 En otro modo preferido de dicho método, la planta de tomate es una planta de la especie *Solanum lycopersicum*, más preferentemente una planta de tomate cultivada.

En todavía otros aspectos, la invención presente se refiere a una planta de tomate fácil de conseguir por un método según la invención presente y a una parte de planta, preferentemente una fruta o una semilla, extraída de la dicha planta de
20 tomate novedosa e inventiva. Dicha parte de planta en una alternativa preferida comprende partes de planta convenientes para la propagación vegetativa.

En todavía otros aspectos, la invención presente se refiere a la utilización del alelo que confiere la resistencia contra ToTV, dicho alelo está localizado en una región genómica vinculada a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216,
25 P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15, /M49-F-330, P13/M38-F-311/313 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS, preferentemente a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313, más preferentemente a marcadores AFLP P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS sobre el cromosoma 4 de tomate:

30 - para seleccionar plantas de tomate ToTV resistentes,

- para conferir resistencia a ToTV en una variedad de tomate ToTV susceptible aumentando la frecuencia de la presencia de alelo resistente en dicha variedad.

5 En todavía otros aspectos, la invención presente se refiere a la utilización de una planta ToTV resistente para aumentar la producción de y/o para prevenir la pérdida de producción en la dicha planta que es resultado de la infección ToTV, en la que dicha planta ToTV resistente está caracterizada por la presencia homocigoto del alelo localizado en una región genómica vinculada a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS, preferentemente a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313, más preferentemente a marcadores AFLP P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS sobre el cromosoma 4 de tomate.

10 En todavía otros aspectos, la invención presente se refiere a la utilización de una semilla de una planta ToTV resistente de la invención presente, para producir una planta ToTV resistente o para prevenir la presencia de enfermedad torrado (o una enfermedad relacionada como marchitez o la enfermedad de punto de chocolate) en una planta o en una población de plantas.

15 En todavía otros aspectos, la invención presente se refiere a la utilización de una planta que comprende al menos un alelo que confiere la resistencia a ToTV, o es homocigoto para un alelo que confiere la resistencia a ToTV, en la que dicho alelo está localizado en una región genómica vinculada a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS, preferentemente a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313, más preferentemente a marcadores AFLP P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS sobre el cromosoma 4 de tomate, como una planta de tomate ToTV resistente o como una planta paternal en programas de cultivos dedicados al suministro de otras plantas con el fenotipo ToTV resistente que es resultado de la presencia homocigoto de dicho alelo.

En todavía otros aspectos, la invención presente se refiere a la utilización de marcador P11/M35-F-216, P13/M38-F-311/313 y/o C2_At5g25900 para descubrir la presencia de un alelo que confiere la resistencia a ToTV en una planta. Dicha utilización generalmente implicaría métodos de detección ácido nucleicos incluyendo

5 pasos como aislar el ADN, amplificando dicho ADN aislado con las cartillas específicas de marcador, y comprobando el fragmento de ADN amplificado para la longitud esperada en pares de base, opcionalmente después de la sintetización del fragmento de dicho ADN amplificado, revelar la presencia de polimorfismos de nucleótido asociados con la resistencia alelo.

10 En los modos preferidos de los aspectos de utilización descritos de la invención presente se dice que la planta es preferentemente una planta de tomate, más preferentemente una planta de una planta de tomate comercialmente valiosa, como una planta de tomate que comprende características comercialmente deseables como se describe aquí *entre otras cosas*.

15

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un mapa esquemático del genoma de tomate representando el cromosoma 4, e indicando las posiciones más recientes de un número de marcadores conocidos.

20 La figura 2 muestra un gel agarosa con fragmentos de PCR sintetizados con una enzima de restricción específica para indicar la presencia o la ausencia de la resistencia alelo para la resistencia ToTV como se describe en el Ejemplo 2.

DESCRIPCIÓN DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN PREFERIDOS

25 Como se utiliza aquí, el término "alelo(s)" significa cualquiera de una o de varias formas alternativas de un gen, todo lo relacionado con alelos se refiere a al menos un rasgo o característica. En una célula diploide u organismo, dos alelos de un gen determinado ocupan loci correspondientes sobre un par de cromosomas homólogos. Debido a que la invención presente se refiere a los métodos que

30 comprenden los pasos para identificar las regiones genómicas que pueden comprender uno o varios genes, pero también secuencias reguladoras, es más exacto en algunos casos referirse a "haplotipo" (p. ej. un alelo de un segmento cromosómico)

en lugar de "alelo", sin embargo, en aquellos casos, el término "alelo" debería ser entendido para comprender el término "haplotipo".

"Un gen" es definido aquí como una unidad hereditaria que consiste en una secuencia de ADN que ocupa una posición específica sobre un cromosoma y que
5 contiene la instrucción genética para las características particulares o el rasgo en un organismo.

"Un locus" es definido aquí como la posición que un gen dado ocupa sobre un cromosoma de una especie dada.

Como se utiliza aquí, el término "heterocigoto" significa una existencia de
10 condición genética cuando diferentes alelos residen en loci correspondientes sobre cromosomas homólogos.

Como se utiliza aquí, el término "homocigoto" significa una existencia de condición genética cuando idénticos alelos residen en loci correspondientes sobre cromosomas homólogos.

15 Como se utiliza aquí, el término "marcador molecular" se refiere a un indicador que es utilizado en métodos para visualizar diferencias de las características de secuencias ácido nucleicas. Los ejemplos de tales indicadores son los marcadores de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), los marcadores de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP),
20 polimorfismos de nucleótido singularizares (SNPs), marcadores microsatélite (por ejemplo. SSRs), los marcadores de la región caracterizada por secuencia amplificada (SCAR), secuencia polimórfica amplificada y cortada (CAPS) o marcadores isozima o combinaciones de los marcadores descritos aquí que definen una posición específica genética y cromosómica.

25 Como se utiliza aquí, el término "tomate" significa cualquier planta, línea o población de *Lycopersicon* incluyendo, pero no limitada a *Lycopersicon cerasiforme*, *Lycopersicon cheesmanii*, *Lycopersicon chilense*, *Lycopersicon chmielewskii*, *Lycopersicon esculentum* (o *Solanum lycopersicum*), *Lycopersicon hirsutum*, *Lycopersicon parviflorum*, *Lycopersicon pennellii*, *Lycopersicon peruvianum*,
30 *Lycopersicon pimpinellifolium*, o *Solanum lycopersicoides*. Los parientes salvajes del tomate moderno han sido clasificados dentro del género *Lycopersicon*, como *L. pennellii*, *L. hirsutum*, *L. peruvianum*, *L. chilense*, *L. parviflorum*, *L. chmielewskii*,

L. cheesmanii, *L. cerasiforme*, y *L. pimpinellifolium*. Durante los ultimos pocos años pasados, hubo un debate entre investigadores de tomate y botánicos sobre si hay que clasificar de nuevo los nombres de esta especie. El nombre científico recién propuesto para el tomate moderno es *Solanum lycopersicum*. Asimismo los nombres de la especie salvaje pueden ser cambiados. *L. pennellii* puede convertirse en *Solanum pennellii*, *L. hirsutum* puede convertirse en *S. habrochaites*, *L. peruvianum* puede ser dividido en *S. 'N peruvianum'* y *S. 'Callejon de Huayles*, *S. peruvianum*, y *S. corneliomuelleri*, *L. parviflorum* puede convertirse en *S. neorickii*, *L. chmielewskii* puede convertirse en *S. chmielewskii*, *L. chilense* puede convertirse en *S. chilense*, *L. cheesmaniae* puede convertirse en *S. cheesmaniae* o *S. galapagense*, y *L. pimpinellifolium* puede convertirse en *S. pimpinellifolium* (Solanacea Genome Network (2005) Spooner y Knapp; http://www.sgn.cornell.edu/help/about/solanum_nomenclature.html).

Una planta según la invención presente existe en la naturaleza. Incluso se ha identificado como consecuencia de un proceso técnico. La invención presente revela dos métodos principales para identificar dicha planta. En un primer método la planta se identifica utilizando una resistencia bioensayo que implica la exposición de una planta candidata a una dosificación eficaz del virus de Tomate torrado (ToTV) (por inoculación mecánica o por exposición en el campo) como se define aquí. Cuando la planta candidata está libre de la enfermedad, cuyos síntomas incluyen lesiones necróticas que finalizan en una necrosis completa (parecida a una quemadura) del material de planta (sobre todo en las hojas) y la muerte de la planta y/o anillos concéntricos de manchas necróticas en la fruta, se dice que dicha planta es resistente. La planta identificada usando este método comprende dos alelos comprendiendo un gen que confiere la resistencia al virus de Tomate torrado (ToTV), y por consiguiente es homocigoto para el rasgo.

El término "resistente a ToTV" se propone para incluir la resistencia a ToTV, incluyendo la cepa depositada ToTV-E01 (DSM 16999), así como a un virus relacionado. Un virus relacionado en el contexto de la invención presente es no sólo un virus que pertenece al mismo género taxonómico de ToTV, sino que puede ser definido como un virus al cual la resistencia es conferida por la resistencia alelo descrita aquí.

Una planta de la invención presente comprende al menos un gen que confiere la resistencia a ToTV. El locus del gen está vinculado para un número de marcadores AFLP como se identifica aquí. Sin embargo, la posición de muchos de estos marcadores AFLP sobre el mapa genómico de tomate es aún desconocida. Por lo tanto, la posición del gen en el genoma no está completamente segura. Debido a que el marcador P14/M49-F-282 está localizado provisionalmente sobre el cromosoma 4, ello sugiere que el loci está localizado sobre el cromosoma 4. Comparando la posición de marcadores públicamente conocidos con aquellos de P14/M49-F-282, parece ser que el gen está localizado en una región entre las fronteras puestas por CT264 (Tomato EXPEN 2000 posición 86 cM) y el marcador TG163 de Tomate EXPEN 2000 posición 135 cM). Una planta de la invención presente puede ser caracterizada así teniendo un gen de resistencia ToTV localizado sobre el cromosoma 4 sobre una posición entre los marcadores CT264 y TG163.

En un análisis más detallado de marcadores presentes en una población de tomate experimental comprendiendo plantas resistentes y susceptibles, se detectó que dos marcadores eran polimorfos entre la población y tenían alta correlación con la presencia o la ausencia de alelo resistente: COSII/CAPS marcador C2_At5g25900 (ver Ejemplo) y un marcador bi-alélico llamado P13/M38-F-311/313. Estos marcadores se colocan sobre el Cromosoma 4 de tomate y podrían ser calculado a partir de la frecuencia de nueva combinación observada que estos marcadores estaban separados por una distancia de aproximadamente 3 cM. La posición de C2_At5g25900 se muestra en la Figura 1. La posición de P13/M38-F-311/313 en relación con C2_At5g25900 no podía ser establecida debido a la ausencia en la población probada de otros marcadores polimorfos con posiciones de mapa conocidas. Por lo tanto, esto puede llevar a la conclusión de que el gen que confiere la resistencia a ToTV en el tomate está asociado con una región caracterizada por marcadores polimorfos C2_At5g25900 (en particular el marcador que produce 420 bp y el fragmento 260 de bp cuando es sintetizado con MseI, dicho marcador está vinculado al alelo resistente) y P13/M38-F-311/313 (en particular P13/M38-F-313, que está vinculado al alelo resistente, dicha región cubre una extensión de ADN sobre el cromosoma 4 que representa una distancia genética de aproximadamente 3

cM, más preferentemente entre 0 y 10cM, todavía más preferentemente entre 0 y 3,6 cM, más preferentemente menos de 3 cM.

5 La persona experta será capaz de distinguir la orientación de los dos marcadores el uno en relación con el otro sobre el mapa genético de tomate (por ejemplo similar en la Fig. 2, cuando la distancia de cada uno al tercer marcador puede ser determinada. Dichos experimentos son bien conocidos por la persona experta.

10 Se ha descubierto que las plantas de la invención presente son resistentes al agente viral que causa la enfermedad de tomate conocida en México por el nombre de "marchitez". Se cree que este agente viral es el mismo que el solicitado bajo el número de registro DSM 16999 y asignado por el nombre de virus de Tomate torrado (ToTV). ToTV que es el agente causante de una enfermedad similar en el tomate en España llamado "torrado". Se detectó que los marcadores como se describen aquí que están vinculados para la resistencia al virus ToTV solicitado bajo el número de
15 solicitud DSM 16999 también están vinculados para la resistencia a "marchitez". Por lo tanto, las plantas como se definen aquí son resistentes a "torrado" así como a "marchitez". Así las plantas como se describen aquí confieren la resistencia a:

- todos los virus que son los agentes causantes de las enfermedades que causan enfermedades en plantas de tomate con los mismos o síntomas similares
20 como aquellos causados por el virus solicitado ToTV DSM 1699;

- todos los virus de planta que pertenecen al mismo taxón que el de ToTV (cuya clasificación taxonómica todavía tiene que ser determinada), preferentemente los virus de planta de la misma familia, más preferentemente del mismo género, todavía más preferentemente de la misma especie;

25 - ToTV DSM 16999.

En un método alternativo de identificación de una planta de la invención presente en la naturaleza, la planta es identificada examinando la presencia de al menos un marcador molecular vinculado a al menos un alelo de dicho gen de resistencia ToTV. La invención presente revela ahora varios marcadores AFLP que
30 son convenientes para la utilización en dicho ensayo de selección, ya que han sido encontrados para ser vinculados en varias medidas a la presencia del gen de resistencia en plantas de tomate. Un marcador conveniente molecular puede ser

seleccionado del grupo que consiste en marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, y P13/M38-F-311/313, preferentemente del grupo que consiste en marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 y P13/M38-F-311/313, más preferentemente del grupo que consiste en marcadores AFLP P11/M35-F-216 y P13/M38-F-311/313. El Ejemplo describe la relación entre estos marcadores y el rasgo de resistencia más detalladamente.

La invención se refiere además a un método para identificar una planta ToTV-resistente, o parte de la misma. Hay varias posibilidades de identificar plantas ToTV-resistentes. En un primer conjunto de modos de dicho método, el virus activo/infeccioso o reproducciones infecciosas de cuerpo entero pueden ser utilizados, mientras que en un modo alternativo únicamente se utilizan medios de detección de virus.

Un primer paso de un método para identificar una planta ToTV-resistente que utiliza el virus activo/infeccioso comprende la exposición de una planta o parte de una planta, como una hoja o un segmento de tallo, a una dosificación infecciosa de ToTV, el objetivo de lo cual es alcanzar una infección. La exposición en muchos casos puede implicar el establecimiento de contacto físico. Una dosificación infecciosa puede variar entre plantas y entre ToTV-aislado probado. Teóricamente, una cantidad de aproximadamente 1 a 10 a una cantidad de aproximadamente 500-5000 partículas virales de dicho virus o los ácidos nucleicos del mismo será suficiente. La infección puede ser alcanzada de este modo por la inoculación mecánica de partículas de virus purificadas o virus ácido nucleico sobre plantas sanas o por ejemplo por la inoculación pasiva vía exposición a plantas infectadas.

O bien, la infección puede ser alcanzada por, por ejemplo:

- crecimiento de un vástago sano sobre un rizoma ToTV-infectado, o viceversa;
- exposición de una planta sana a vectores de transmisión conteniendo el virus (incluyendo plantas infectadas, p.ej. plantas parásitas como *Cuscuta* spp.);
- introduciendo en una planta sana una expresión vector que hospeda una región de codificación del virus genoma ToTV;
- la utilización de reproducciones agro-infecciosas, como cepas *Agrobacterium tumefaciens* que contienen una expresión vector que hospeda una región de codificación del virus genoma ToTV.

En el contexto de la invención presente, los métodos para exponer una planta o la parte de planta a una dosificación infecciosa de ToTV no están limitados a ningún método particular.

5 Como se ha declarado, la infección puede comprender la inoculación mecánica del virus sobre plantas sanas. Por ejemplo, una parte de una hoja enferma puede ser frotada directamente en una hoja de una planta que debe ser infectada. En un procedimiento alternativo, una inoculación puede por ejemplo estar preparada moliendo el virus conteniendo tejido de planta, preferentemente hojas preferentemente jóvenes que muestran síntomas, con la mano de mortero y, o
10 cualquier otro tipo conveniente de homogeneizador, en por ejemplo un "buffer" (sistema tampón) conveniente para inoculación (*p. ej.* un "buffer" (sistema tampón) de fosfato 0.03M., de pH 7.7). Después de la molienda, lo homogeneizado obtenido (la savia) es filtrado preferentemente, *p. ej.* con una gasa de algodón. La savia puede ser entonces inoculada, por ejemplo poniendo en contacto hojas con una cantidad de
15 savia. Las hojas son preferentemente pretratadas para dañar la epidermis inferior y aumentar la entrada del virus. Esto puede llevarse a cabo pre-espolvoreando las hojas con polvo de carborundum. Se debe evitar una herida excesiva. Preferentemente se utiliza un polvo carborundum que tiene pequeñas partículas angulares microscópicas de carburo de silicio (400-500 mesh). El polvo de Carborundum también puede ser
20 añadido directamente a la savia, en el caso de que se omita el pretratamiento. La savia, por ejemplo, puede ser aplicada con el índice, con una almohadilla de espuma empapada o tela con savia, o incluso con mano de mortero utilizada para la molienda, una espátula de cristal, un cepillo rígido, o una pistola. Después de la inoculación, se lavan las hojas preferentemente inmediatamente con agua.

25 Un segundo paso de un método para identificar una planta ToTV-resistente comprende la identificación de dicha planta como una planta ToTV-resistente cuando, después de dicha exposición, o i) síntomas de enfermedad en dicha planta o en parte de planta permanecen ausentes o se retrasan en su expresión o al menos se reducen en severidad o están relativamente localizados en relación con una planta de
30 control susceptible y/o sensible, y/o ii) el virus ToTV o secuencias ToTV genómicas no están presentes en dicha planta o parte de planta o la presencia de virus ToTV es al menos cuantitativamente reducida en dicha planta en relación con una planta de

control susceptible. Como se utiliza aquí el término localizado significa limitado a la hoja inoculada.

La determinación del desarrollo de síntomas de enfermedad ToTV-inducidos en plantas infectadas puede ser realizada por métodos cuantitativos, p. ej. en el que
5 el período requerido para el desarrollo perceptible (p. ej. visible) se observan los síntomas de enfermedad, o bien por métodos cualitativos en los que, después de un cierto período transcurrido, se inspecciona la planta para la expresión de síntoma y se indica la presencia o la severidad de los síntomas.

Además de la determinación del desarrollo de síntomas de enfermedad ToTV-inducidos o como una alternativa, dependiendo del tipo de ToTV-resistencia a ser
10 detectada, la presencia del virus es descubierta en la planta o la parte de planta. Para detectar la ausencia de virus en las plantas de prueba, puede utilizarse en principio cualquier método. Por ejemplo, puede ser empleado un método en el que se utiliza un anticuerpo ToTV específico, juego de cartilla o sonda según la invención
15 presente. O bien, una parte de la planta de prueba puede ser puesta en contacto con una planta de indicador susceptible (p. ej. *N. hesperis* '67A') para establecer si el virus está presente o ausente en la planta de prueba. La persona experta entenderá que para tales métodos es importante descontaminar la superficie de la planta de prueba, para distinguir entre una transmisión vector, una planta de prueba
20 tolerante y una planta de prueba resistente, ya que únicamente la presencia de virus en las células de planta tiene que ser establecida.

En la realización del segundo paso de un método para identificar una planta ToTV-resistente, se pueden obtener los resultados siguientes. Si, después de la
inoculación acertada (por ejemplo después del establecimiento de un contacto de
25 virus de planta en las condiciones que causarían la infección una planta de control susceptible y sensible):

i) los síntomas de enfermedad permanecen ausentes; o partículas virales ARN viral no pueden ser descubiertos: la planta es resistente;

ii) los síntomas de enfermedad se retrasan o se reducen en severidad; o
30 factores sistémicos bajos en partículas virales o ARN viral puede ser detectado: la planta es parcialmente resistente;

iii) los síntomas de enfermedad son severos, pero permanecen locales, limitados a la hoja inoculada y no hacen sistemáticamente la extensión más allá de la inoculación del tejido; o partículas virales, o ARN viral sólo pueden ser detectados en la zona: la planta es hipersensible;

5 iv) si los síntomas de enfermedad permanecen ausentes; o el ARN viral puede ser detectado: la planta es tolerante.

v) si la planta desarrolla síntomas de enfermedad y tiene alto el factor virus sistémico, entonces la planta es susceptible y sensible. Los ejemplos de dichas plantas son las plantas de las cuales el virus de la presente invención fue aislado.

10 Estas plantas pueden servir como plantas de control convenientes en los métodos de la presente invención.

Para el objetivo de producir plantas resistentes, y desde un punto de vista de fitodescontaminación, únicamente los resultados i), ii) e iii) pueden ser considerados de interés. Para el objetivo de obtener plantas convenientes para la producción de cosechas sin síntomas y productos, el resultado iv) también puede ser de interés particular comercial.

15 En un modo alternativo de un método para identificar una planta ToTV-resistente únicamente se utiliza el medio de detección de virus. Por ejemplo, una planta ToTV-resistente puede ser identificada en el campo observando o
20 identificando una planta sin síntomas entre plantas sintomáticas y determinando la ausencia de virus en dicha planta realizando un método de detección de virus. Cuando dicho método se realiza es preferible que se utilicen un polinucleótido ToTV-selectivo o un anticuerpo. Preferentemente, un método para identificar una planta ToTV-resistente requiere la utilización del virus o polinucleótido selectivo de virus o
25 anticuerpo.

La invención presente revela ahora todavía otro método remoto para identificar una planta ToTV-resistente, determinando la presencia homocigoto de marcadores vinculados a un supuesto gen de resistencia ToTV, para cuyos marcadores se proporcionan varios ejemplos.

30 La invención se refiere además a un método para producir una planta ToTV-resistente, o parte de la misma. Una vez una planta ToTV-resistente ha sido identificada, esta planta puede servir como planta donante de material genético que

debe ser transferido de dicha planta donante a una planta receptora para proveer dicha planta receptora de material genético. La transferencia de material genético de una planta donante a una planta receptora puede hacerse por cualquier método conveniente conocido en el ramo. El material genético va a ser en la mayor parte de casos material genómico. Es importante sin embargo, que al menos las partes que confieren resistencia de genoma de la planta donante sean transferidas. En ausencia de métodos para determinar que las partes de genoma de la planta donante confieren la resistencia ToTV, la transferencia puede ocurrir adecuadamente transfiriendo cromosomas completos. Preferentemente, la planta ToTV-resistente sirve como una planta masculina o femenina paternal en un cruce para producir plantas descendientes resistentes, la planta descendiente recibe así el material genómico del donante resistente y actúa como planta receptora. Aunque un padre susceptible en cruces no sea en sentido estricto necesariamente una planta receptora, dicho padre susceptible será incluido también aquí en el término de planta receptora.

En un método para producir una planta ToTV-resistente, la fusión protoplasto puede también ser utilizada para la transferencia de material genómico que confiere resistencia de una planta donante a una planta receptora, p. ej. como una forma de cruce de dichas plantas. La fusión protoplasto es una unión inducida o espontánea, como una hibridación somática, entre dos o más protoplastos (las células de cuyos tabiques celulares se extraen por tratamiento enzimático) para producir una única célula bi o una célula multi- nuclear. La célula fusionada que puede incluso ser obtenida con la especie de planta que no puede ser criada naturalmente, es el tejido cultivado en una planta híbrida que muestra la combinación deseable de rasgos. Más expresamente, un primer protoplasto puede ser obtenido de una planta de tomate u otra línea de planta que expone resistencia a la infección por ToTV. Por ejemplo, puede ser utilizado un protoplasto de una línea de tomate ToTV-resistente. Un segundo protoplasto puede ser obtenido de una segunda línea de planta susceptible, opcionalmente de otra especie de planta o variedad, preferentemente de la misma especie de planta o variedad, que comprende características comercialmente deseables, como, pero no limitadas a, la resistencia a enfermedad, la resistencia a insectos, características de fruta valiosas, etc. Los protoplastos son entonces

fusionados utilizando procedimientos de fusión tradicionales protoplasto, que son conocidos en el ramo para producir el cruce.

O bien, el rescate de embrión puede ser empleado en la transferencia de material genómico que confiere resistencia de una planta donante a una planta receptora p. ej. como una forma de cruce de dichas plantas. El rescate de embrión puede ser utilizado como un procedimiento para aislar el embrión de cruces en el que las plantas fallan en producir la semilla viable. En este proceso, el ovario fertilizado o la semilla inmadura de una planta son el tejido cultivado para crear nuevas plantas (este método se describe detalladamente en Pierik, 1999).

Un método para producir una planta ToTV-resistente comprende así en un modo los pasos de identificar una planta donante ToTV-resistente o una planta que comprende al menos un alelo del gen de resistencia (una planta portadora) como se describe aquí y el cruce de dicha planta donante ToTV-resistente o dicha planta portadora con una planta receptora. Por consiguiente, por cruce remoto y autofecundación, pueden ser obtenidas plantas homocigoto resistentes al virus.

Un método de producir una planta ToTV-resistente comprende después el paso de seleccionar de plantas descendientes una planta resistente realizando un método para identificar una planta ToTV-resistente como se ha descrito anteriormente.

Preferentemente, dicha planta receptora es una planta de tomate de la especie *Solanum lycopersicum*, más preferentemente una planta *S. lycopersicum* que posee características comercialmente deseables. La planta receptora puede ser una planta ToTV-susceptible, o una planta ToTV sensible o ToTV resistente. Como se ha explicado anteriormente, la opción de la planta se determina por el hecho de que el rasgo de resistencia es recesivo. La persona experta es consciente de varias metodologías disponibles para resolver tales cuestiones.

Asímismo un aspecto de la invención presente es una planta ToTV-resistente, o parte de la misma, fácil de conseguir por un método de la invención.

Un método para producir una planta ToTV-resistente puede comprender la transferencia por introgresión de una secuencia nucleico ácida que confiere resistencia de una planta donante ToTV-resistente o una planta que tiene el gen de

resistencia en forma de heterocigoto en una planta receptora cruzando dichas plantas.

En un método, que se menciona como el cultivo de pedigrí, una planta donante que expone la resistencia a ToTV (homocigoto) puede ser cruzada con una planta receptora que expone preferentemente características comercialmente deseables, como pero no limitadas a, la resistencia a enfermedad, la resistencia a insectos, características de fruta valiosas, etc. La población de planta resultante (representando los híbridos F_1) es entonces autopolinizada y se le permite poner la semilla (semillas F_2). Las plantas F_2 nacidas de las semillas de F_2 son entonces examinadas para la resistencia a ToTV o para la presencia homocigoto de marcadores vinculados al gen de resistencia. Así, la población descendiente puede ser examinada de diversos modos.

Producción de plantas de tomate ToTV-resistentes por métodos transgénicos

Según otro aspecto de la invención presente, una secuencia ácido nucleico (preferentemente ADN) que comprende al menos uno de los marcadores vinculados al gen de resistencia ToTV como se identifica aquí, puede ser utilizada para la producción de una planta de tomate ToTV-resistente. Una vez identificada como una planta de tomate donante conveniente, la secuencia nucleico ácida que comprende un gen para la ToTV-resistencia, puede ser transferida a una planta receptora conveniente mediante cualquier método disponible. Por ejemplo, dicha secuencia nucleico ácida puede ser transferida cruzando una planta de tomate donante ToTV-resistente con una planta de tomate receptora susceptible (p. ej. por introgresión), por transformación, por la fusión protoplasto, por una técnica doble haploide o por rescate de embrión o por cualquier otro sistema de transferencia nucleico ácida, opcionalmente seguido de la selección de plantas descendientes que comprenden el gen heterocigoto u homocigoto y/o exposición a ToTV-resistencia. Para los métodos transgénicos de transferencia una secuencia nucleico ácida que comprende un gen para la ToTV-resistencia, puede ser aislada de dicha planta donante utilizando métodos conocidos en el ramo y la secuencia nucleico ácida así aislada puede ser transferida a la planta receptora por métodos transgénicos, por ejemplo mediante un

vector, en un gameto, o en cualquier otro elemento de transferencia conveniente, como una partícula balística cubierta de dicha secuencia nucleico ácida.

La transformación de planta generalmente implica la construcción de una expresión vector que funcionará en células de planta. En la invención presente, dicho
5 vector comprende una secuencia nucleico ácida que comprende un gen para ToTV-resistencia, cuyo vector puede comprender un gen ToTV de resistencia-conferida que está bajo control de o vigentemente vinculado a un elemento regulador, como un estimulador. La expresión vector puede contener una o más de dichas combinaciones de elemento gen/regulador vinculadas de forma operable, siempre y cuando al menos
10 uno de los genes contenidos en las combinaciones codifica para la ToTV-resistencia. El(los) vector (s) puede(n) ser en forma de un plasmido, y puede(n) ser usado(s), sólo(s) o en combinación con otros plasmidos, para proporcionar las plantas transgénicas que son resistentes a ToTV, utilizando métodos de transformación conocidos en el ramo, como el sistema de transformación *Agrobacterium*.

15 La expresión vectores puede incluir al menos un gen de marcador, vinculado de forma operable a un elemento regulador (como un estimulador) que permite a células transformadas que contienen al marcador ser el uno o el otro recuperado por la selección negativa (inhibiendo el crecimiento de las células que no contienen el gen de marcador seleccionable), o por la selección positiva (seleccionando para el
20 producto codificado por el gen de marcador). Se utilizan más comúnmente genes de marcador seleccionables para la transformación de planta conocidos en el ramo, e incluyen, por ejemplo, genes que cifran para enzimas que desintoxican metabólicamente a un agente selectivo químico que puede ser un antibiótico o un herbicida, o los genes que codifican un objetivo cambiado que es insensible al
25 inhibidor. Se conocen varios métodos de selección positivos en el ramo, como la selección manosa. O bien, la transformación sin marcadores puede ser utilizada para obtener plantas sin los genes de marcador mencionados, técnicas para las cuales se conocen en el ramo.

Un método para introducir una expresión vector en una planta está basado en
30 el sistema de transformación natural de *Agrobacterium* (ver p. ej. Horsch *et al.*, 1985). *A. tumefaciens* y *A. rhizogens* son bacterias de planta que provienen de tierra patógena que transforma genéticamente células de planta. Los plasmidos Ti y Ri de

A. tumefaciens y *A. rhizogens*, respectivamente, llevan genes responsables de la transformación genética de la planta (ver p. ej. Kado, 1991). Los métodos de introducir la expresión vector en el tejido de planta incluyen la infección directa o el co-cultivo de células de planta con *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch *et al.*, 1985).

- 5 Se proporcionan descripciones de sistemas de vector *Agrobacterium* y métodos para transferencia *Agrobacterium-mediada* génica por Gruber y Crosby, 1993 y Moloney *et al.*, 1989. Ver también, la patente de los EEUU No 5.591.616. Existen descripciones generales de expresión de vectores planta y genes indicadores y protocolos de transformación y descripciones de sistemas de vector *Agrobacterium* y
- 10 métodos para la transferencia *Agrobacterium-mediada* génica que se pueden encontrar en Gruber y Crosby, 1993. Miki *et al.*, 1993 y Phillips, *et al.*, 1988, que proporcionan por ejemplo métodos generales de cultivo de tejidos de planta,. Un manual de referencia apropiado para técnicas de reproducción moleculares y la expresión vectores conveniente es Sambrook y Russell (2001).

- 15 Otro método para introducir una expresión vector en una planta está basado en la transformación mediada por microproyectil en el que el ADN es llevado a la superficie de microproyectiles. La expresión vector es introducida en tejidos de planta con un dispositivo biolístico que acelera los microproyectiles a velocidades de 300 a 600 m/s que es suficiente para penetrar en tabiques celulares de planta y
- 20 membranas (Ver, Sanford *et al.*, 1987, 1993; Sanford, 1988, 1990; Klein *et al.*, 1988 *Al.*, 1992). Otro método para introducir el ADN en plantas es vía la sonicación de células objetivo (Ver Zhang *et al.*, 1991). O bien, liposoma o la fusión esferoplasto ha sido utilizado para introducir la expresión vectores en plantas (ver por ejemplo Deshayes *et al.*, 1985 y Christou *et al.*, 1987). La sintetización directa de ADN en protoplastos
- 25 que utiliza precipitación CaCl_2 , el alcohol de polivinilo o poly-L-ornitina también ha sido descrita (ver por ejemplo, Hain *et al.*, 1985 y Pañero *et al.*, 1982). También ha sido descrita la electroporación de protoplastos y células enteras y tejidos (D'Halluin *et al.*, 1992 y Laursen *et al.*, 1994).

- Después de la transformación de tejidos de tomate objetivo, la expresión de
- 30 dichos genes de marcador seleccionables anteriormente descritos permite la selección preferencial de células transformadas, tejidos y/o plantas, utilizando métodos de

regeneración y de selección ahora bien conocidos en el ramo. Los marcadores como se definen aquí también pueden ser utilizados para dicho objetivo.

Producción de plantas de tomate ToTV-resistentes por métodos no-transgénicos

- 5 En un modo alternativo para producir una planta de tomate ToTV-resistente, la fusión protoplasto puede ser utilizada para la transferencia de ácidos nucleicos de una planta donante a una planta receptora. La fusión protoplasto es una unión inducida o espontánea, como una hibridación somática, entre dos o más protoplastos (las células de cuyos tabiques celulares se extraen por tratamiento enzimático) para
10 producir una única célula bi- o multi-nucleada. La célula fusionada, que incluso puede ser obtenida con especies de planta que no pueden ser cruzadas en la naturaleza, es tejido cultivado en una planta híbrida que muestra la combinación deseable de rasgos. Más expresamente, un primer protoplasto puede ser obtenido de una planta de tomate u otra línea de planta que muestra resistencia a la infección
15 por ToTV. Por ejemplo, un protoplasto de cualquiera de las líneas resistentes como se indica en el Ejemplo puede ser utilizado. Un segundo protoplasto puede ser obtenido de un segundo tomate u otra variedad de planta, preferentemente una línea de tomate que comprende características comercialmente deseables, como pero no limitadas a, la resistencia a enfermedad, la resistencia a insectos, características de
20 fruta valiosas, etc. Los protoplastos son entonces fusionados utilizando procedimientos de fusión protoplasto tradicionales, conocidos en el ramo.

- O bien, el rescate de embrión puede ser empleado en la transferencia de un gen de resistencia de una planta donante a una planta receptora. El rescate de embrión puede ser utilizado como un procedimiento para aislar el embrión de cruces
25 en los que las plantas fallan en la producción de semilla viable. En este proceso, el ovario fertilizado o la semilla inmadura de una planta es el tejido cultivado para crear plantas nuevas (Pierik, 1999).

- La invención presente también se refiere a un método para producir una planta de tomate ToTV-resistente que comprende los pasos de realizar un método
30 para descubrir la presencia de un alelo asociado con la resistencia a ToTV en una planta de tomate donante según la invención como se describe anteriormente, y transferir una secuencia nucleico ácida que comprende dicho alelo así descubierto, de

dicha planta donante a una planta de tomate receptora ToTV-susceptible. La transferencia de dicha secuencia nucleico ácida puede ser realizada por cualquiera de los métodos anteriormente descritos aquí.

5 Un modo preferido de dicho método comprende la transferencia por introgresión de dicha secuencia nucleico ácida de una planta de tomate donante ToTV-resistente en una planta de tomate receptora ToTV-susceptible cruzándose dichas plantas. Esta transferencia puede ser así adecuadamente lograda utilizando técnicas de cultivo tradicionales. Los genes de resistencia ToTV son preferentemente introgresados en variedades de tomate comerciales utilizando cultivo asistido por
10 marcador (MAS). El cultivo asistido por marcador o la selección asistida por marcador implican la utilización de uno o varios de los marcadores moleculares para la identificación y la selección de aquellas plantas descendientes que contienen uno o varios de los genes que codifican para el rasgo deseado. En el caso presente, dicha identificación y selección están preferentemente basadas en la selección de
15 marcadores asociados con el gen de resistencia como se identifica aquí.

Plantas de tomate ToTV-resistentes y semillas

Una planta de tomate ToTV-resistente, o una parte de la misma , fácil de conseguir por un método de la invención es también un aspecto de la invención
20 presente.

Las plantas de tomate ToTV-resistentes de la invención presente pueden ser de cualquier tipo genético como innato, híbrido, haploide, dihaploide, partenocarpo o transgénico. Además, las plantas de la invención presente pueden ser heterocigoto u homocigoto para el rasgo de resistencia, preferentemente homocigoto. Aunque el
25 alelo identificado en la invención presente, pueda ser transferido a cualquier planta para asegurar una planta ToTV-resistente, los métodos y las plantas de la invención se relacionan preferentemente con las plantas de la familia *Solanaceae*, más preferentemente el tomate.

Líneas de planta de tomate innatas ToTV-resistentes pueden ser
30 desarrolladas utilizando las técnicas de selección recurrente y retrocruce, autofecundación y/o dihaploides o cualquier otra técnica utilizada para hacer líneas paternas. En un método de selección y retrocruce, la ToTV-resistencia puede ser

79

introgresada en una planta receptora objetivo (que se llama padre recurrente) cruzando al padre recurrente con una primera planta donante (que es diferente del padre recurrente y referida aquí como " padre simultáneo "). El padre recurrente es una planta que es no resistente o tiene un nivel bajo de resistencia a ToTV y posee características comercialmente deseables, como pero no limitadas a, la resistencia a enfermedad, la resistencia a insectos, características de fruta valiosas, etc. El padre simultáneo muestra la resistencia ToTV y comprende una secuencia nucleico ácida que codifica para la resistencia ToTV. El padre simultáneo puede ser cualquier variedad de planta o la línea innata que es un cruce fértil con el padre recurrente. La progenie que es resultado de una mezcla del padre recurrente paternal y simultáneo se retrocruza al padre recurrente. La población de planta está entonces examinada. La población puede ser examinada de varios modos diferentes. Por ejemplo, la población puede ser examinada utilizando bioensayos de resistencia o una prueba de campo como se ha descrito antes aquí. Las plantas híbridas F1 que exponen un fenotipo ToTV-resistente comprenden el requisito nucleico ácido de codificación de secuencia para la resistencia ToTV, y poseen características comercialmente deseables, son entonces seleccionadas y autofecundadas y seleccionadas para un número de generaciones (hasta 5, 6, 7 u 8 generaciones) para permitir a la planta de tomate hacerse cada vez más innata. Este proceso de autofecundación continuado y selección puede ser realizado para dos a cinco o más generaciones. El resultado de dicho cultivo y selección es la producción de las líneas que son genéticamente homogéneas para los genes asociados con la resistencia ToTV así como otros genes asociados con los rasgos de interés comercial. En lugar de utilizar las pruebas de patología fenotípica de bioensayos, pueden realizarse MAS utilizando uno o varios de los marcadores moleculares arriba descritos, sondas de hibridación o polinucleótidos para identificar aquella progenie que comprende una codificación de secuencia nucleico ácida para la ToTV-resistencia. O bien, los MAS pueden ser utilizados para confirmar los resultados obtenidos de bioensayos cuantitativos. Una vez son hechas las selecciones apropiadas, el proceso se repite. El proceso de retrocruce al padre recurrente y de selección para la ToTV-resistencia se repite para aproximadamente cinco o más generaciones. La progenie que es resultado de este proceso es heterocigoto para uno o varios genes que codifican para la ToTV-resistencia. La

última generación retrocruce es entonces reproducida para asegurar la progenie de cultivo homocigoto pura para ToTV-resistencia.

Las líneas de tomate ToTV-resistentes innatas descritas aquí pueden ser utilizadas en cruces adicionales para crear plantas ToTV-resistentes híbridas. Por ejemplo, una primera planta de tomate ToTV-resistente innata de la invención puede ser cruzada con una segunda planta de tomate innata que posee rasgos comercialmente deseables como pero no limitadas a, la resistencia a enfermedad, la resistencia a insectos, características de fruta deseables, etc. Esta segunda línea de tomate innata puede o no ser ToTV-resistente, pero preferentemente tiene al menos un alelo para la resistencia ToTV vinculado a los marcadores definidos aquí de modo que al menos el 50 % de las plantas descendientes expresen el fenotipo ToTV resistente. Más preferentemente, la segunda línea de tomate innata es también ToTV resistente, de modo que el fenotipo resistente se conserve a pesar de los cruces. De este modo, una primera planta de tomate ToTV-resistente innata de la invención puede ser utilizada para introgresar un rasgo adicional hereditario en la segunda línea de planta de tomate innata.

Otro aspecto de la invención presente se refiere a un método para producir semillas que pueden ser convertidas en plantas de tomate ToTV-resistentes. En un modo, el método comprende los pasos de proporcionar una planta de tomate ToTV-resistente de la invención, cruzándose dicha planta ToTV-resistente con otra planta de tomate ToTV-resistente, y recogiendo semillas que son resultado de dicho cruce, que cuando se plantan, producen plantas de tomate ToTV-resistentes híbridas.

En otro modo, el método comprende los pasos de proporcionar una planta de tomate ToTV-resistente de la invención, cruzándose dicha planta ToTV-resistente con una planta *Solanum lycopersicum*, recogiendo semillas que son resultado de dicho cruce, regenerándose dichas semillas en plantas, seleccionando plantas ToTV-resistentes mediante cualquiera de los métodos aquí descritos, autocruzando las plantas seleccionadas para un número suficiente de generaciones para obtener las plantas que son fijadas para un alelo que confiere la ToTV-resistencia en las plantas, retrocruzando las plantas así producidas con plantas *S. lycopersicum* que tienen rasgos deseables fenotípicos para un número suficiente de generaciones para obtener plantas *S. lycopersicum* que son ToTV-resistentes y tienen rasgos deseables

fenotípicos, y la recolección de las semillas producidas de las plantas que son resultado del último retrocruce, que cuando se plantan, producen las plantas de tomate que son ToTV-resistentes.

Por vía del ejemplo, y no de limitación, se darán ahora los Ejemplos de la invención presente.

EJEMPLO

Ejemplo 1

10 Identificación de marcadores vinculados al gen de resistencia ToTV en el tomate

El objetivo de este experimento era identificar marcadores AFLP vinculados a la resistencia ToTV en el tomate, por la utilización de un Bulk Segregant Analysis (BSA; Michelmore, R. W., I. Paran y R.V. Kesseli, 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. 15 UU, 88: 9828-9832).

La ToTV resistencia resultó ser el rasgo recesivamente monogénico heredado. El análisis fue realizado sobre 150 plantas de una cepa de tomate F2 cuyo cruce de plantas F3 eran fenotipados. Para la determinación de un fenotipo fiable, la fenotipación fue repetida varias veces sobre plantas F3 para un subconjunto de 20 plantas F2. Basado en los resultados obtenidos por la fenotipación repetida, 18 individuos resultaron ser resistentes de una manera fiable y nueve plantas resultaron ser susceptibles de una manera fiable. Estas plantas fueron usadas para el BSA. La información fenotípica de estos individuos está catalogada en la tabla 1.

25 Identificación de marcador y verificación

Nomenclatura de marcador

Códigos por los cuales comúnmente se indica la combinación de cartilla AFLP, p. ej. P14/M49-F-282, en el que P y M son el PstI común y MseI las secuencias de cartilla o cartillas universales (Vos et al., 1995; Bai et al., 2003) seguidos por 2 ó 3 bases suplementarias selectivas como se indica por un código dos de extensión de 30 dígito. Dos códigos de extensión de dígito son como sigue: 11: AA; 13: AG; 14: EN; 15: CA; 21: GG; 25: TG; 35: ACA; 38: ACTO; 49: CAG; 51: CCA; 61: CTG. 282 es el

tamaño aproximado en pares de base del fragmento resultante polimorfo (tamaño dado $\pm$ 2 pares de base). El tamaño normalmente se da redondeado, pero también se puede dar en decimales. Este fragmento fue amplificado en las plantas investigadas. La cartilla y secuencias de adaptador son descritas detalladamente por Bai et al. 2003.

El marcador TG163 (Expen 2000; SOL Genomics Network; <http://www.sgn.cornell.edu/index.pl>) consiste en una cartilla avanzada e inversa de la secuencia siguiente:

10

Secuencia avanzada:

15

TCTGGGATCATATATGGGATCTTAGAATGCTGAAGTTTCCAGTCTTGATCTCCCTGGACATAGTCACTGGTAATACTCTGTGGCAATAA
TGAAAGCTGCTTGCCATCTCTTAATTAGTGGATTTTGGATATAAGATTATTGCTGGTCCCTCAATGTGTGTCTCACTATGCTGCTAG
AACTTAATGACTGCTAACTTTTGTGTTAGGGTTAGGGTTAGAAGTTTCTTCTGGATTACCAATTCCTTATTGAGTAAATGCAGTTGA
TGTTTGTGCGACAGACATGGACTGTCAAGTGCAATCCGGAACATGAAGACTTAATTCTGTTCTTCTCTTCATTTCCTTTATGTTG
TCTACCCATGTATCTGGAAAACATAGTTGTGCACACTCTCACTGAGCC

20

Secuencia inversa:

CTTAGAAGCTTCCGATGAAAATGAACGTCAAACTCATACTAGATAAAATTAAAGAGACCTCTTGCAAAATTCTACATTCACCTCAGC
AGCGTTAACTCCATCATGAACACATCAAGAATACAGATTTGGAGGGGGATATACTGGAGTGATACAAACATTAAATAAGAGATGAGTAG
TGTTGGCAAGGGATAATGAGCTCAAAAGATGGATCAAGAGTTTCATACTTACTTCGAGTTGTACTGATTTATTTCTTGGAAGATGAGGCT
TGATTGATTCTACAACCACCTGTTAGGAAAAAATGCTAAATTAAACATGAAAACAGGTGGTCCCAATTCTCAACTTAAATAAGACA
ACTCTATTAGACTATTATCATGTATTAGAAAATAGCAAAATTGCGAAGATACATGCACACTCATGGGAACATTTCTATGTTATCCT
GAAATTGGCTCAGAAAGTCCAAACACAAAGAAAAGACAGATG

25

Material biológico

Se dispuso de material de hoja de un número total de 300 plantas F2 para la evaluación. De éstas, un número total de 150 plantas fueron fenotipadas en base al fenotipo de las plantas F3 extraídas de estos individuos F2. El ADN genómico fue aislado del material de hoja de estas 150 plantas fenotipadas (Tabla 1) y se generaron plantillas PstI/MseI para la toma de las huellas dactilares de AFLP de estas muestras de ADN. Posteriormente, fue generada una huella dactilar de prueba por la utilización de combinación de cartilla P14/M50 sobre todas las plantas.

35 BSA y verificación sobre individuos

El BSA se comenzó examinando 96 combinaciones de cartilla sobre un grupo que contiene diez (10) individuos que son resistentes a ToTV y un grupo que contiene nueve (9) individuos que son susceptibles a ToTV (Tabla 2). Esta selección causó la

identificación de tres (3) marcadores candidatos (P11/M54-F-233/235 (bi-alelo), P14/M49-F-282 y P15/M49-F-330) que posteriormente fueron verificados sobre 32 individuos, consistiendo en un total de dieciocho (18) individuos disponibles ToTV resistentes, nueve (9) individuos ToTV susceptibles y cinco (5) individuos cuyo fenotipo no podía ser evaluado inequívocamente (Tabla 3). En base a esta selección, el marcador P14/M49-F-282 apareció como el marcador más estrechamente vinculado al gen de resistencia ToTV.

Un segundo BSA fue realizado cuyas 96 combinaciones de cartilla fueron examinadas sobre el grupo R y grupo S (consistiendo ahora en nueve y ocho individuos, respectivamente). Esta selección causó la identificación de dos marcadores candidatos (P21/M61-F-583 y P25/M51-F-131) que junto con un marcador de la prueba BSA anterior (P15/M49-F-330) fueron verificados sobre los 32 individuos ya mencionados (Tabla 3). Ninguno de los marcadores adicionales examinados pareció ser más cercanamente vinculado que el mejor marcador vinculado P14/M49-F-282, identificado en la primera ronda de BSA.

Debido a que el marcador P14/M49-F-282 pareció ser el marcador más estrechamente vinculado, se decidió examinar este marcador sobre los 150 individuos fenotipados. Los resultados se presentan en la Tabla 5. Se identificó un total de 17 recombinantes (Tabla 4). Los fenotipos fueron divididos en tres clases:

- resistente (A) = la tasa de infección Total es inferior al 25 %
- segregador (H) = la tasa de infección Total está entre el 25 % y el 75 %
- susceptible (B) = la tasa de infección Total es superior al 75 %

En base a esta clasificación en la combinación con los genotipos de marcador P14/M49-F-282, un total de 28 recombinantes fueron identificados, que corresponden a una distancia entre el marcador y el gen de resistencia ToTV de aproximadamente 9,5 cM. Esto es según el tamaño determinado del dispositivo (9 cM), en el cual el gen de resistencia ToTV se localiza entre el marcador P14/M49-F-282 y P11/M35-F-216 (Tabla 3). Este cálculo está basado en las líneas utilizadas para BSA y que, como se creía, tenían el fenotipo más fiable.

Debido a que el marcador P14/M49-F-282, que pareció ser el más estrechamente vinculado de todos los marcadores probados, estaba todavía a

bastante gran distancia del locus, se deseaban los marcadores que fueron vinculados más estrechamente. Por lo tanto se realizó una tercera selección BSA, en la cual fueron examinadas 72 combinaciones de cartilla, llevando el número total de combinaciones de cartilla examinadas a 263. En esta tercera selección, nueve
 5 marcadores candidatos (en seis combinaciones de cartilla) fueron identificados, los cuales fueron verificados como ocho resistentes y ocho individuos susceptibles (Tabla 3). Dos marcadores (P11/M35-F-216 y el marcador bi-alelo P13/M38-F-311/313) parecieron ser los más estrechamente vinculados. Debería ser notado que la posición de marcador P11/M35-216 es provisional actualmente, ya que su posición está
 10 basada en un sólo recombinante. Los dos marcadores P11/M35-F-216 y P13/M38-F-311/313 fueron protegidos posteriormente sobre un grupo más grande de individuos de los cuales no había ninguna información fenotípica disponible, incluyendo 17 recombinantes y 28 individuos resistentes y susceptibles (Tabla 5).

15 El Marcador P13/M38-F-311 está vinculado al alelo sensible. El fragmento 311-pares de base que está amplificado entre las cartillas tiene la secuencia siguiente (278 de 311 bases han sido determinadas por fuentes fidedignas):

20 AGCTCTTGCAAGTTGTTTCATCTTCTTTTCAGTTGTGATTCACTATCTGCCAAAAAT
 CAAAGAAAAGGAATAATTAGAAAATCAAGCAAATATAGTTTTGGTCAAGCAAAT
 AAACAAGTATGGCTGGTTCTCAAAAATTGTCAAAGCTAAACTAATAAAAAGAAG
 CCAGATTCCTCATAGAATGAAAAGTATTTCTATAGAACAACGCGCAATACCATG
 GATGAGCTAAATACACATACATGAAAGTACTCAGTAGCCTTGAACACATATGAT
 GGGAAGT

25

El Marcador P13/M38-F-313 está unido al alelo resistente. El fragmento 313-pares de base que está amplificado entre las cartillas tiene la secuencia siguiente (284 de 313 bases han sido determinadas por fuentes fidedignas):

30 AGCTCTTGCAAGTTGTTTCATCTTCTTTTCAGTTGTGATTCACTATCTGCCAAAAAT
 CAAAGGAAAGGAATAATTAGAAAATCAAGCAAATATAGTTTTGGTCAAGCAAAT
 AAACAAGTATGGCTGGTTCTCAAAAATTGTCAAAGCTAAACTAATAAAAAGAAG

CTAGATTCCTCATAGAATGAAAAGTATTTCTATAGAACAACGCGCTATACCATG
GATGAGCTAAACTACACATACATGAAAGTACTCAGTAGCCTTGAACACATATGA
TGGGAAGTTTACT

5 El Marcador P11/M35-F-216 está vinculado para el fenotipo resistente. El fragmento 216-pares de base que está amplificado entre las cartillas tiene la secuencia siguiente (185 de 216 bases han sido determinadas por fuentes fidedignas)

AATGAGGGAACATTCTTTTGGGCAAAGTGGCATTCTTGATAATCTTCTCACATT
10 CAAGAATGGTATATAACTCTTTATGACTTCACAAATATCAACTGATCCATTTTGG
ACTGCAAAATTTGTGAACCTCTTTTCCTCTGCCATAATTAGTAAATTATATTACC
AAACAATAAAATTGTTTACT

Selección de dos marcadores candidatos vinculados a líneas germoplasma

15 Los dos marcadores P11/M35-F-216 y P13/M38-F-311/313 fueron identificados como estrechamente vinculados a la resistencia ToTV. Debería ser notado que la distancia entre el gen y el marcador es difícil de determinar, ya que la interpretación de los fenotipos tiene una gran influencia sobre la distancia calculada. Estos marcadores fueron examinados en un grupo germoplasma de 83 individuos. En
20 base a esta selección, el marcador P11/M35-F-216 parece tener un valor predictivo del 90.4 % y el marcador P13/M38-F-311/313 parece tener un valor predictivo del 96.4 % (Tabla 6).

Colocación de resistencia ToTV sobre el genoma tomate

25 Pruebas experimentales en la combinación con los mapas de genoma propietarios de marcadores de tomate sugirieron que el marcador P14/M49-F-282 estuviera localizado sobre el cromosoma 4. Por lo tanto, se espera que la base genética de resistencia ToTV esté localizada sobre el cromosoma 4. Se descubrieron dos marcadores flanqueando sobre el cromosoma 4: el marcador bi-alelo P13/M38-F-
30 311/313 y el marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS (Ver el Ejemplo 2). Cuando este marcador COS II/CAPS es sintetizado con MseI, el fenotipo sensible (homocigoto susceptible) proporciona dos fragmentos de respectivamente 360 bp y 260 bp,

mientras que el fenotipo resistente (homocigoto) proporciona dos fragmentos de respectivamente 420 bp y 260 bp; las plantas que tienen los tres fragmentos tienen alelos que son heterocigotos (p. ej. susceptibles) (ver la Figura 2 para un gel representativo mostrando los productos sintetizados PCR de una población de prueba que consiste en los tres tipos de plantas; la migración es de menos a más, las medidas de marcadores indican 100, 200, 300 bp etc. fragmentos).

La secuencia unigen (ID: SGN-U228314 basada en la fecha del 30 de junio de 2004; Unigen SGN-U332034 de 5 de abril de 2007) para el marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS en Lycopersicon es:

AAATTGGGCTGAAACTTATGGACCTATTTATTCCATCAAAACCGGCGCAAATAC
AATTGTTGTACTCAGTTCTAGTGAAGGAGGCTATGGTGAAGTAGATA
TTCATCCATCTCAACTAGAAAGCTAACAACGCATTGAGAATCCTTACTTGTGAT
AAGAGTATAGTCGCGATAAGTGATTACGATGAGTTTCACAAGACAGCGAAGCGC
CACATACTGACCAGTGTTCTAGGACCAACTGCTCAGAAACGCTTCCGTATCCAC
AGGGACACCTTGGTAGAAAATGTGTCAAAGCAACTACATGATTTGGTTAGGACT
GATCCTAACGAAGCAATTAATCTAAGGAAGTCATTTTCAGTCGGAACCTTTTGGTT
TAGCATTGAAACAAGCTTTGGG

Conclusión

Examinando un total de 263 PstI/MseI PCs en dos grupos de individuos resistentes y susceptibles y los pasos de verificación subsecuentes, un total de cuatro marcadores (un bi-alelo) pareció estar vinculado a la resistencia ToTV. La distancia entre los marcadores y el gen de resistencia ToTV es difícil de determinar, pero en base a los fenotipos traducidos y genotipos de marcador P14/M49-F-282 la distancia es estimada en 9,5 cM. Esto es según el tamaño calculado del dispositivo, de 9 cM en el cual el gen de resistencia ToTV está localizado. Este cálculo está basado en las líneas que se cree que son los fenotipos más fiables.

Los Marcadores P11/M35-F-216 y P13/M38-F-311/313 (bi-alelo) fueron verificados sobre 83 individuos germoplasma. En base a esta selección, los marcadores tienen un valor predictivo del 90,4 % y el 96,4 % respectivamente. La

presencia de líneas que se desvían podría ser explicada por la variación alelo en el locus ToTV o la nueva combinación.

El gen de resistencia ToTV está más probablemente localizado sobre el cromosoma 4 como se indica por la presencia de marcador P14/M49-F-282 sobre
5 aquel cromosoma.

En base al relativamente alto número de marcadores candidatos vinculados identificados por la utilización de 263 PCs, es probable que el gen de resistencia ToTV sea una introgresión de un acceso de tomate salvaje.

10 Ejemplo 2

Utilización del marcador C2_At5g25900 y enzima de restricción Mse I para descubrir la resistencia recesiva para ToTV.

Muestra:

15 Se preparó una muestra de ADN de tejido de tomate de cada planta de una población de prueba utilizando técnicas de preparación estándar (micropreparatorio, p. ej. en referencia a Fulton TM, Chunwongse J, y Tanksley SD. (1995) Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. Plant Molecular Biology Reporter 13 (3): 207-209.).

20

Las sustancias químicas PCR fueron las siguientes:

- dNTP's (2mM Stock) (Amersham Bioscience)
- SuperTherm polimerasis (Integro)
- Cartilla hacia adelante (10ng / μ l) 5' TGC TAA TTG GGC TGA AAC TTA TGG
- 25 - Cartilla inversa (10ng / μ l) 5' TGT TAG CTT TCT AGT TGA GAT GGA TG
- 10xPCR "buffer" 25mM MgCl₂
- Cargador de "buffer"
- Ethidiumbromide (10mg/ml)
- 1x TE
- 30 - 0,5X TBE (Duchefa)
- Enzima de restricción Mse I (New England Biolabs)

La mezcla PCR consistió en (por muestra)

	2.0	μl 10x PCR parachoques (25mM MgCl ₂)
	2.0	μl mezcla de dNTP's (2mM de cada dNTP's))
5	3.0	μl cartilla Avanzada (10 ng / μl)
	3.0	μl cartilla inversa (10 ng / μl)
	0.05	μl SuperTherm polimerasis
	8.95	μl H ₂ O
	1.1	μl cadena ADN
10		

El perfil termocíclico PCR era así:

3 min. @ 94 ° C; (30 seg.s. @ 94 ° C, 1 min. 65 ° C, y 1 min. 72 ° C) para 32 ciclos;
mantener @ 4 ° C

15

Los productos PCR fueron sintetizados con Mse I siguiendo las instrucciones del fabricante. La electroforesis fue realizada en geles con 1.5 % agarosa.

Puntuación de marcadores:

- 20 Puntuación 1 = 360 bp + 260 bp = homocigoto susceptible
Puntuación 2 = 420 bp + 360 bp + 260 bp = heterocigoto
Puntuación 3 = 420 bp + 260 bp = homocigoto resistente

El fenotipo fue anotado por separado de los híbridos.

25

Resultados y discusión:

Una fotografía del gel presentada en la Figura 2, muestra los productos sintetizados PCR de la población de prueba que consiste en los tres tipos de plantas; la migración de menor a mayor, la medida de los marcadores indican fragmentos

30 100, 200, 300 bp etc.).

P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS, preferentemente a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313, más preferentemente a marcadores AFLP P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS sobre el cromosoma 4 de tomate, como una planta de tomate ToTV resistente o como una planta paternal en programas de cultivo destinados al suministro a otras plantas con el fenotipo ToTV resistente que es resultado de la presencia homocigoto de dicho alelo.

28. Utilización de marcadores AFLP P13/M38-F-311/313, P11/M35-F-216 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS para detectar la presencia de un alelo que confiere resistencia a ToTV en una planta.

29. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 24 y 28, en el que dicha planta es una planta de tomate.

Título: Plantas ToTv resistentes

SUMARIO

5 La presente invención se refiere a una planta de tomate teniendo en su genoma al menos un alelo de un gen que confiere resistencia al virus de Tomate torrado (ToTv), dicho virus ha sido solicitado ante la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 24 de Noviembre de 2004 bajo la solicitud de referencia nº ToTv-E01 (DSM 16999).

10

15

20

25

30

Figura 1

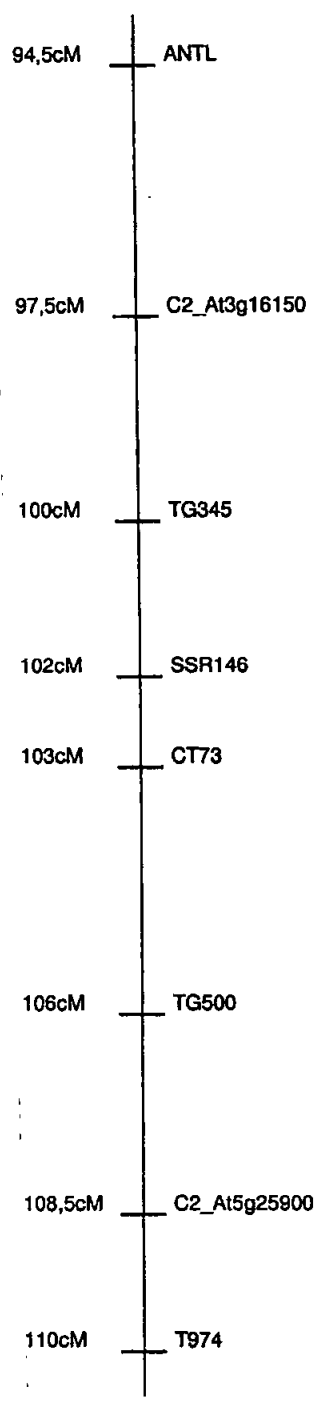
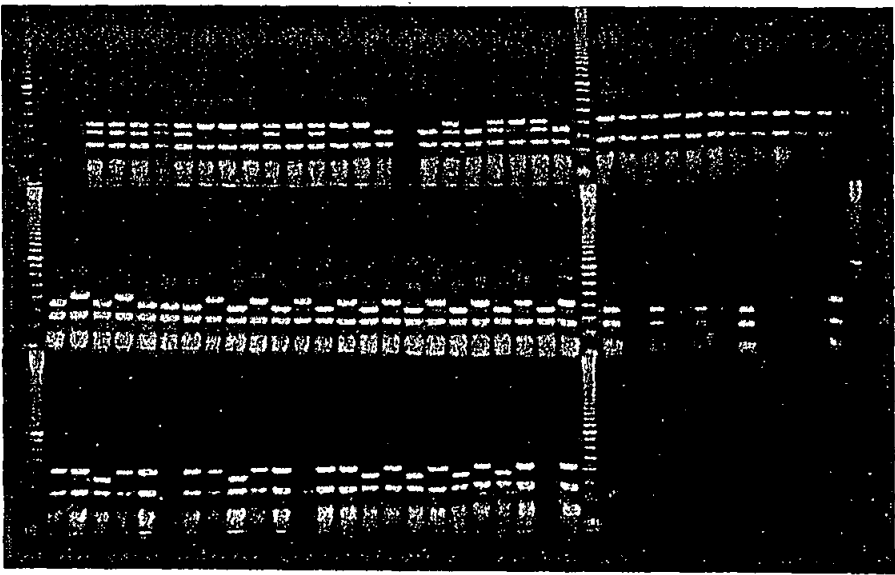


Figura 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2007/050260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01H1/00 A01H5/00 C12Q1/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A01H
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MEJIA ET AL: "EVALUATION OF TOMATO GERMPLASM FOR RESISTANCE TO GEMINIVIRUSES IN SANARATE. GT - CHOCOLATE SPOT DISEASE OF TOMATO IN GUATEMALA:" INTERNET CITATION, [Online] March 2003 (2003-03), XP002384317 Retrieved from the Internet: URL: http://www.plantpath.wisc.edu/GeminivirusesResistantTomatoes/CDR/Mar03/ChocSpot.htm [retrieved on 2006-06-08] the whole document	1-3,6-8, 11,12, 20-23,26
P,X	WO 2006/085749 A (RUITER SEEDS R & D B V DE [NL]; VAN DEN HEUVEL JOHANNES FRANCI [NL]; M) 17 August 2006 (2006-08-17) * p. 1:2-4:8, 6:1-7:17, 22:7-25:12, 48:1-55:20, claims * ----- -/-	1-3,6-8, 11,12, 19-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.	☒ See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 20 September 2007	Date of mailing of the international search report 10/10/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer PUONTI-KAERLAS, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2007/050260

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VERBEEK M ET AL.: "Tomato torrado virus, a new virus infecting tomato" ADVANCES IN PLANT VIROLOGY, April 2006 (2006-04), XP009073206 * abstract *	1-12,14, 17, 19-25, 27-29
Y	BAI YULING ET AL: "QTLs for tomato powdery mildew resistance (Oidium lycopersici) in Lycopersicon parviflorum G1.1601 co-localize with two qualitative powdery mildew resistance genes." MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 16, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 169-176, XP002451564 ISSN: 0894-0282 cited in the application * p. 169-172, 174-175 *	1-12,14, 17, 19-25, 27-29
Y	THOMAS COLWYN M ET AL: "Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to Cladosporium fulvum" PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 5, 1995, pages 785-794, XP002404216 ISSN: 0960-7412 * p. 786-790, 792,793 *	1-12,14, 17, 19-25, 27-29
A	HAANSTRA J P W ET AL: "An integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two Lycopersicon esculentum X L. pennellii F2 populations" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 99, no. 1-2, July 1999 (1999-07), pages 254-271, XP002404217 ISSN: 0040-5752	
A	AGRAMA H A ET AL: "Quantitative trait loci for tomato yellow leaf curl virus and tomato mottle virus resistance in tomato" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE, vol. 131, no. 2, March 2006 (2006-03), pages 267-272, XP009074143 ISSN: 0003-1062	
A	WO 2006/046861 A (RUITER SEEDS R & D B V DE [NL]; VAN KAN JOHANNES ARNOLDUS LAUR [NL]; T) 4 May 2006 (2006-05-04) ----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2007/050260

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EMBL [Online] 28 July 1999 (1999-07-28), "EST268513 tomato ovary, TAMU Lycopersicon esculentum cDNA clone cLED37I1, mRNA sequence." XP002451754 retrieved from EBI accession no. EMBL:AI899070 Database accession no. AI899070 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL2007/050260

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. ☒ Claims Nos.: 13, 15, 16, 18, 26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(11) PCT - Essentially biological process for the production of plants
- 2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
- 3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

- 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
- 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
- 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/NL2007/050260

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 2006085749	A	17-08-2006	AU	2006213170 A1	17-08-2006
WO 2006046861	A	04-05-2006	AU	2005300181 A1	04-05-2006
			CA	2584780 A1	04-05-2006
			EP	1652930 A1	03-05-2006

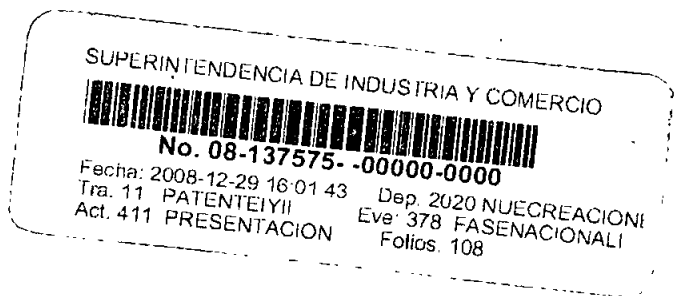
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
1) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A01H 001/000	
2) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) DE RUITER SEEDS R & D B.V.	
30) Prioridad	(31) Prioridad 06076141.8 60/803,663 1033758	(32) Fecha 01/06/2006 01/06/2006 25/04/2007	(33) País EP US NL
		(72) Inventor(es) PAULUS CORNELIS MARIS Y OTROS	
		(74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
35) Fecha limite inicio fase nacional: 01/01/2009		(87) Publicación internacional	
36) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 06/12/2007	
Fecha de presentación de la solicitud: 01/06/2007		N° publicación: WO 2007/139386 A1	
No. de solicitud PCT/NL2007/050260			

4) Título: PLANTAS TO-TV RESISTENTES

Reivindicación(es):

1. Planta teniendo dentro de su genoma al menos un alelo de un gen que confiere resistencia al virus de Tomate torrado (ToTV), dicho virus habiendo sido solicitado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH el 24 de noviembre de 2004 bajo el número de referencia de solicitud ToTV-E01 (DSM 16999).
2. Planta según la reivindicación 1, en la que dicha planta es una planta del género Solanaceae, más preferentemente una planta de tomate.
3. Planta según la reivindicación 1, en la que dicha planta es una planta de la especie Solanum lycopersicum.
4. Planta según la reivindicación 3, en la que dicho alelo está localizado en una región genómica vinculada a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, P13/M38-F-311/313 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS, preferentemente a marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216 y P13/M38-F-311/313, más preferentemente a marcadores AFLP P11/M35-F-216 y/o P13/M38-F-311/313 y/o marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS.
5. Planta según la reivindicación 4, en la que dicho alelo está localizado sobre el cromosoma 4, preferentemente en una región genómica colocada entre los marcadores AFLP P14/M49-F-282 y P11/M35-F-216, aún más preferentemente entre el marcador AFLP P13/M38-F-311/313 y el marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS.
6. Planta según cualquiera de las reivindicaciones 1a 5, en la que dicho alelo está presente en forma de homocigoto.

7. Planta según cualquiera de las reivindicaciones 1a 6 en la que dicha resistencia está expresada como resistencia al establecimiento de una infección.
8. Planta según cualquiera de las reivindicaciones 1a 6 en la que dicha planta está identificada en una prueba de resistencia bioensayo implicando infección con virus de Tomate torrado (ToTV) como se define en la reivindicación 1, opcionalmente seguida de una selección de implicación de método para la presencia de al menos un marcador molecular vinculado a dicho alelo de dicho gen ToTV resistente.
9. Planta según cualquiera de las reivindicaciones 1a 8 en la que dicha planta es producida por una selección de implicación de método para la presencia de al menos un marcador molecular vinculado a dicho alelo de dicho gen de resistencia ToTV, opcionalmente seguido de una resistencia bioensayo implicando infección con el virus de Tomate torrado (ToTV) como se define en la reivindicación 1.
10. Planta según la reivindicación 9, en la que al menos un marcador molecular está seleccionado del grupo que consiste en los marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P21/M61-F-583, P25/M51-F-131, P15/M49-F-330, y P13/M38-F-311/313 y el marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS, preferentemente del grupo que consiste en los marcadores AFLP P14/M49-F-282, P11/M35-F-216, P13/M38-F-311/313 y el marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS, más preferentemente del grupo que consiste en los marcadores AFLP P11/M35-F-216, P13/M38-F-311/313 y/o el marcador C2_At5g25900 COSII/CAPS.
11. Parte de planta extraída de una planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

OFICIAL DE CAJA : 08 - 95,318
: DICIEMBRE 9 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEBITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
TER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102218955	09/12/2008	45,848,000.00

***** CONCEPTO *****

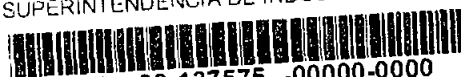
DEBITANTE	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
	TOTAL :	\$ 501,000.00

QUINIENTOS UN MIL PESOS

LIBRABLE : 

OFICIAL DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. Cdo 16029-841-002-0

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-137575-00000-0000

Fecha: 2008-12-29 16:01:43 Dep. 2020 NÚCLEO DE INNOVACIÓN
Línea 11 PATENTE Y DISEÑO Eve 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACIÓN Folios 108

io

SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Carolina Rodríguez

Firma Responsable

Fecha 01-12-07

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
DE RUITER SEEDS R &D B.V.

REFERENCIA	Radicación No.	8 137575
	Solicitud internacional	PCT/NL2007/050260
	Fecha inicio fase nacional	01/01/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1061

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 30 ENE. 2009
jfernand