



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 179 640**

⑤① Int. Cl.⁷: A01H 5/10

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **99915886.8**

⑧⑥ Fecha de presentación: **08.04.1999**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1 069 819**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2001**

⑤④ Título: **Procedimiento para el incremento selectivo de los glucosinolatos anticarcinogénicos de la especie Brassica.**

③⑩ Prioridad: **09.04.1998 US 81169 P**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.01.2003

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.01.2003

⑦③ Titular/es: **Plant Bioscience Limited
Norwich Research Park, Colney Lane
Norwich, Norfolk NR4 7UH, GB**

⑦② Inventor/es: **Mithen, Richard y
Faulkner, Kathy**

⑦④ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

DESCRIPCION

Procedimiento para el incremento selectivo de los glucosinolatos anticarcinogénicos de la especie *Brassica*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para el incremento selectivo de los derivados de glucosinolatos anticarcinogénicos de la especie *Brassica*, así como a la especie *Brassica* con niveles elevados de derivados de los glucosinolatos anticarcinogénicos y en particular a las hortalizas comestibles *Brassica* con niveles elevados de los derivados de glucosinolato anticarcinogénicos 4-metilsulfinilbutil isotiocianato y/o 3-metilsulfinilpropil isotiocianato. La presente invención proporciona asimismo procedimientos para la selección de combinaciones genéticas de brócoli que contienen niveles elevados de derivados de los glucosinolatos anticarcinogénicos y los procedimientos para evaluar las propiedades anticarcinogénicas de dichas combinaciones genéticas. La presente invención se refiere además a composiciones de materia que incluyen las hortalizas *Brássica* con concentraciones de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato de entre 10 y 100 μ moles/g en peso seco.

Antecedentes de la técnica

La presente invención proporciona procedimientos para la producción de las hortalizas *Brassica* con niveles elevados de glucosinolatos y sus derivados. En particular la invención proporciona procedimientos para la producción y selección de las hortalizas *Brássica* con niveles elevados de 3-metilsulfinilpropil y/o 4-metilsulfinilbutil glucosinolato. Dichos glucosinolatos son convertidos mediante la actividad del enzima mirosinasa en derivados isotiocianato que han demostrado ser potentes inductores de los enzimas detoxificantes de fase II, la elevada actividad de los cuales está asociada a una susceptibilidad reducida a los efectos neoplásicos de los carcinógenos. La invención proporciona combinaciones genéticas que 1) exhiben niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato, y 2) exhiben baja actividad del alelo GSL-ALK que codifica una actividad capaz de convertir dichos glucosinolatos en derivados alquenilo, que no poseen las propiedades anticarcinogénicas de los derivados isotiocianato de dichos glucosinolatos, y 3) una actividad mirosinasa adecuada capaz de producir derivados isotiocianato de dichos glucosinolatos. En consecuencia, dichas combinaciones genéticas proporcionan niveles elevados de glucosinolatos específicos, una producción reducida de derivados alquenilo de dichos glucosinolatos y favorecen la producción de los derivados isotiocianato de dichos glucosinolatos. La invención se refiere además a la utilización de marcadores genéticos para seleccionar las combinaciones genéticas descritas anteriormente.

Se conoce que una dieta con un elevado contenido en verduras está asociada a una reducción en el riesgo de ciertos tipos de cáncer y es por tanto deseable incluir una cantidad significativa de verduras en la dieta humana. La actividad anticarcinogénica de las verduras se ha asociado a la presencia de varias clases de metabolitos secundarios. Aumentan las pruebas de que algunos de estos metabolitos secundarios están implicados en la reducción del riesgo de ciertos tipos de cáncer y por ello se consideran anticarcinogénicos. En consecuencia, el incremento de los niveles de los metabolitos anticarcinogénicos proporciona una estrategia útil para reducir el riesgo de cáncer, complementado con el consejo dietético de incrementar el consumo de verduras.

El mecanismo preciso por el cual las verduras proporcionan una disminución en el riesgo de muchos tipos de cáncer no se conoce con certeza, pero existen muchas líneas de evidencia que apoyan la implicación de las verduras en la prevención del cáncer. En particular, el papel de las verduras crucíferas en la prevención del cáncer está ampliamente apoyado por estudios epidemiológicos y más recientemente por estudios bioquímicos.

Una clase de metabolito secundario que está implicado en los efectos beneficiosos de las verduras crucíferas son los derivados isotiocianato de ciertos glucosinolatos. Cuatro piezas complementarias de evidencia sugieren que los isotiocianatos derivados de la hidrólisis de los metilsulfinilalquil glucosinolatos que se encuentran en las crucíferas pueden ser importantes en la dieta humana para reducir el riesgo del cáncer. (1) La provisión dietética de verduras crucíferas protege a los roedores contra los cánceres inducidos químicamente (Wattenberg, L.M. *Cancer Res.*, 45: 1-8 (1985)). (2) Se conoce que los metilsulfinilalquil isotiocianatos son potentes inductores de los enzimas detoxificantes de fase II en las células de hepatoma murino Hepa lclc7 en cultivo (Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G., and Posner, G. H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2399-2403 y Tawfiq, N., Heaney, R. K., Plumb, J. A., Fenwick, G. R., Musk, S. R. R., and Williamson, G., (1995) *Carcinogenesis* 16:1191-1194), que están asociados con una susceptibilidad reducida de los mamíferos y de las células de los mamíferos en cultivo a los efectos

tóxicos y neoplásicos de los carcinógenos. (3) El sulforafane (4-metilsulfinilbutil isotiocianato) bloquea la formación de tumores mamarios en ratas Sprague-Dawley tratadas con 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (Zhang, Y., Kensler, T. W., Cho, C. -G., Posner, G. H., and Talalay, P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3147-3150). (4) Los estudios epidemiológicos muestran que la gente con niveles elevados de verduras en la dieta son menos susceptibles al cáncer (Block, G., Patterson, B., and Suber, A. (1992) *Nutr. And Cancer* 18:1-19). En consecuencia los efectos benéficos de una dieta elevada en ciertos glucosinolatos pueden incluir una reducción en el riesgo de cáncer. Sin embargo, parece ser que los principales responsables de los efectos benéficos son solamente ciertos glucosinolatos y más precisamente, ciertos derivados de glucosinolatos específicos.

En las plantas crucíferas existen numerosos glucosinolatos individuales. Carlson et al., (1987) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112:173-178 determinó la concentración relativa de 13 glucosinolatos en las partes comestibles de 30 cultivos. Los glucosinolatos tienen una porción glicona común y una cadena lateral de aglicona variable. La estructura de la cadena lateral de los glucosinolatos varía en longitud y composición química.

Los glucosinolatos se forman por la acción de un número de enzimas, codificados por un pequeño número de alelos biosintéticos de los glicosinolatos (alelos GSL). En la senda del glucosinolato, la metionina es convertida en homo-metionina y dihomo-metionina por la acción del alelo GSL-ELONG. La homometionina es eventualmente convertida en 3-metiltiopropil glucosinolato seguido por la conversión a 3-metilsulfinilpropil glucosinolato por la actividad del alelo GSL-OXID y finalmente es convertida en 2-propenil glucosinolato por la actividad del alelo GSL-ALK. La dihomo-metionina es convertida en 4-metiltiobutil glucosinolato, después en 4-metilsulfinilbutil glucosinolato por la actividad del alelo GSL-OXID, después en 3-butenil glucosinolato por la actividad del alelo GSL-ALK y finalmente se convierte en 2-hidroxi-3-butenil glucosinolato por la actividad del alelo GSL-OH.

En general, los 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos y los 4-metiltiobutil glucosinolatos producen isotiocianatos no volátiles y en consecuencia dichos glucosinolatos en particular tienen poca contribución al sabor. Por el contrario, los derivados alquenilo volátiles pueden contribuir al sabor, tanto positiva como negativamente, lo que depende de la especie de planta y del derivado de de glucosinolato en particular.

En las hortalizas *B. oleracea*, los glucosinolatos tienen cadenas laterales de 3 ó 4 carbonos. Los glucosinolatos se pueden hidrolizar por la acción de la mirosinasa que es frecuentemente inducida por el daño al tejido. Muchas plantas tienen alquenil (2-propenil y 3-butenil) glucosinolatos que resultan en la producción de productos volátiles cuando son hidrolizados por la acción de la mirosinasa. Algunas hortalizas contienen un 2-hidroxi-3-butenil glucosinolato llamado progoitina. Dicho glucosinolato produce un isotiocianato inestable que se cicla de forma espontánea produciendo oxazolidona-2-tionas, que debido a sus propiedades goitogénicas son indeseables en la dieta. Los isotiocianatos derivados de los alquenil e hidroxialquenil glucosinolatos pueden presentar tanto efectos positivos como negativos en el sabor.

El brócoli acumula niveles bajos de glucosinolatos con cadenas laterales de 4-metilsulfinilbutilo y 3-metilsulfinilpropilo debido a que en el brócoli está muy reducida la actividad de los alelos GSL-ALK, que son responsables de la conversión de los glucosinolatos en derivados alquenilo. Se cree que la popularidad del brócoli como hortaliza es debida en parte a la contribución relativamente modesta que hacen al sabor los derivados 4-metilsulfinilbutil y 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos en contraste con el fuerte sabor producido por otros glucosinolatos, en particular los derivados volátiles de los glucosinolatos.

En consecuencia, los procedimientos para aumentar la cantidad dietética de derivados específicos de isotiocianato de ciertos glucosinolatos puede proporcionar hortalizas con propiedades anticarcinogénica incrementadas sin alterar el sabor y/o la palatabilidad de las hortalizas. Sin embargo, la técnica no proporciona medios para aumentar convenientemente los niveles de glucosinolatos específicos en las crucíferas. Además, la técnica no proporciona una forma conveniente para asegurar que dichos glucosinolatos no son convertidos en los derivados alquenilo, sino en los derivados isotiocianato que tienen propiedades anticarcinogénicas. De entre los numerosos glucosinolatos que pueden producir las verduras del género *Brássica*, el 4-metilsulfinilbutil glucosinolato y el 3-metilsulfinilpropil glucosinolato han sido identificados como los precursores de los derivados de los isotiocianatos anticarcinogénicos más potentes. La técnica no proporciona medios convenientes para aumentar de forma específica dichos glucosinolatos en particular evitando a la vez la formación de otros glucosinolatos o derivados de los glucosinolatos que puedan tener características de sabor indeseables. Los glucosinolatos 4-metilsulfinilbutil glucosinolato y el 3-metilsulfinilpropil glucosinolato se encuentran en varias de las verduras crucíferas, pero son más abundantes en las variedades de brócoli (sin. Calabrese: *Brássica oleracea* L. var. *italica*) que no tiene un alelo funcional del locus GSL-ALK. La presencia de un alelo funcional del alelo GSL-ALK convierte

dichos glucosinolatos en sus homólogos alqueniolo, que son malos inductores de los enzimas de fase II (Tawfiq, N., Heaney, R. K., Plumb, J. A., Fenwick, G. R., Musk, S. R. R., and Williamson, G., (1995) *Carcinogenesis*, 16:1191-1194). En consecuencia la presencia de un alelo funcional de GSL-ALK evita la posibilidad de producir una variedad con niveles elevados de dichos isotiocianatos anticarcinogénicos ya que los glucosinolatos serán convertidos en derivados de alqueniolo. Además la producción de isotiocianatos a partir de los glucosinolatos necesita la actividad del enzima mirosinasa. De ahí que una producción elevada de dichos isotiocianatos específicos depende tanto de los niveles de glucosinolatos precursores (que están influenciados por la actividad codificada en el alelo GSL-ALK) como de los niveles de actividad de la mirosinasa que produce los derivados de isotiocianato de los glucosinolatos.

En consecuencia, resulta deseable una combinación genética que especifique la producción de niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato, pero la producción de los derivados de isotiocianato anticarcinogénicos de dichos glucosinolatos necesita combinaciones genéticas adicionales. Así pues los procedimientos para conseguir dichas composiciones genéticas proporcionan nuevas composiciones de materia que en la actualidad no se encuentran en las verduras crucíferas cultivadas comercialmente. La presente invención da a conocer procedimientos para obtener dichas combinaciones genéticas.

Los niveles de glucosinolatos en el brócoli cultivado comercialmente son relativamente bajos comparados con los que se encuentran en los cultivos de hortalizas tales como la "rocket" (*Eruca sativa*), que acumula 4-metiltiobutil glucosinolato, y "watercrest" (*Rorippa nasturtium-aquaticum*), que acumula fenetil glucosinolato (Fenwick, G. R., Henney, R. K., and Mullin, W. J. (1983) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 18:123-201). Es de esperar que, cuando ingeridos, la exposición a los niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato del brócoli incrementa la potencia de la inducción de los enzimas de fase II. En consecuencia el brócoli con niveles incrementados de los 4-metilsulfinilbutil isotiocianatos y/o 3-metilsulfinilpropil isotiocianatos anticarcinogénicos sería una valiosa adición a la dieta diseñada para disminuir el riesgo de cáncer. Además, es poco probable que dichos cambios conduzcan a una reducción de la palatabilidad ya que los metilsulfinilalquil glucosinolatos no son volátiles y producen una contribución al sabor relativamente pequeña, contrariamente a la mayoría de los demás isotiocianatos que se encuentran en los cultivos de verduras y lechugas (Fenwick, G. R., Heaney, R. K., and Mullin, W. J. (1983) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 18:123-201). En consecuencia la alteración de los niveles de dichos glucosinolatos específicos no cambiaría el sabor de las verduras crucíferas portadoras de las combinaciones genéticas que codifican el carácter.

Muchos de los miembros silvestres del complejo de especies de *Brassica oleracea* (número de cromosomas $n = 9$) tienen niveles elevados de los glucosinolatos alifáticos individuales (Mithen, R., Lewis, B. G. and Fenwick, G. R., (1987) *Phytochemistry* 26:1969-1973 y Giamoustaris, A. and Mithen, R., (1996) *Theor. Appl. Genet.*, 93:1006-1010). Los estudios de la genética de los glucosinolatos en esta taxa han sido instrumentales para el descubrimiento de la senda genética para la biosíntesis de los glucosinolatos. Es evidente que ciertas especies en dicha taxa pueden ser valiosas para los programas de mejora genética diseñados para incrementar de forma específica los 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos y/o los 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, a la vez que se incrementa el potencial anticarcinogénico de la planta. Sin embargo, la técnica no proporciona procedimientos para incrementar la concentración de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato por combinaciones genéticas ni proporciona medios adecuados para poder determinar las propiedades anticarcinogénicas de las verduras que contienen dichas combinaciones genéticas. La presente invención proporciona dichos procedimientos y combinaciones genéticas.

Principalmente entre estas se encuentran combinaciones genéticas que incorporan los genes de los miembros del complejo de *B. villosa-rupestris* de sicilia, que posee un alelo de GSL-ALK no funcional y que podrían ser los progenitores silvestres del brócoli que se cultiva. En consecuencia, la presente invención utiliza parientes silvestres y progenitores del brócoli comercial como fuentes de los genes necesarios para producir una combinación genética capaz de producir niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato y la combinación genética que favorece la producción de los derivados de isotiocianato de dichos glucosinolatos en lugar de los derivados alqueniolo.

El 4-metilsulfinilbutil isotiocianato (también referido como sulforafano), derivado del correspondiente glucosinolato que se encuentra en algunas de las especies de *Brassica*, ha sido identificado como un potente inductor de los enzimas detoxificantes de fase II (p.ej., QR,; quinona reductasa [NADP(H)]: aceptor de quinona oxidoreductasa) en las células del hepatoma murino Hepa 1c1c7. De forma semejante, el 3-metilsulfinilpropil isotiocianato es un inductor fuerte de los enzimas de fase II. La medida de la inducción de QR en las células de hepatoma murino Hepa 1c1c7 proporciona un indicador rápido y fiable de la

capacidad de los extractos vegetales para inducir los enzimas de fase II en las células de los mamíferos (Prochaska, H. J., Santamaría, A. B., and Talalay, P., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2394-2398) y en por consiguiente de la putativa actividad anticarcinogénica. Dicho ensayo ha sido utilizado para determinar el potencial de los isotiocianatos sintéticos (Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. -G., and Posner, G. H., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2399-2403 y Talalay, P., De Long, M. J., and Prochaska, H. J., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8261-8265), los extractos de las verduras crucíferas (Tawfiq, N., Wanigatunga, S., Heaney, R. K., Musk, S. R. R., Williamson, G., and Fenwick, G. R., *Exp. J. Cancer Prev.*, 3:285-292 y los glucosinolatos tratados con mirosinasa (Tawfiq, N., Heaney, R. K., Plumb, J. A., Fenwick, G. R., Musk, S. R. R., and Williamson, G., (1995) *Carcinogenesis*, 16:1191-1194). Sin embargo, el contenido de glucosinato/isotiocianato de los extractos vegetales no ha sido dado a conocer en general ni tampoco el potencial anticarcinogénico relativo de varias de las verduras crucíferas.

En la presente invención, se ha utilizado dicho ensayo para determinar la relación entre la capacidad para inducir actividad QR (potencial anticarcinogénico) y el contenido en glucosinato de tres miembros silvestres del complejo *B. oleracea*, que tienen un elevado nivel de 3-metilpropil (*B. drepanensis*) 3-metilsulfinilpropil (*B. villosa*) y 2-propenil (*B. atlantica*) glucosinolatos respectivamente, cuando se combinan con cultivos de brócoli comercial mediante cruces convencionales e híbridos entre el ascendente silvestre y líneas comerciales de brócoli doble haploide para la reproducción. En consecuencia se han derivado procedimientos y composiciones que identifican las composiciones genéticas necesarias para la producción estable de glucosinolatos específicos (p.ej. de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinato) y la producción de los correspondientes derivados de isotiocianato. Dichas combinaciones genéticas proporcionan líneas para la mejora genética para producir variedades comerciales de brócoli y otras verduras crucíferas con niveles de dichos compuestos anticarcinogénicos 10 a 100 veces superiores a los encontrados en las variedades cultivadas comercialmente.

Se ha encontrado, por ejemplo, que se obtiene un incremento de 10 veces en el nivel de 4-metilsulfinilbutil glucosinato cruzando los cultivares de brócoli con taxas silvestres seleccionadas del complejo de *Brassica oleracea* (número de cromosomas $n = 9$). De forma similar se observan incrementos en los niveles de 3-metilsulfinilpropil glucosinato. El tejido de los híbridos muestra un incremento de 100 veces en la capacidad para inducir la quinona reductasa en las células Hepa 1c1c7 sobre la de los cultivos de brócoli cultivados comercialmente debido tanto al aumento en los glucosinolatos de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil como al incremento en la conversión del 4-metilsulfinilbutil glucosinato a sulforafano. En consecuencia la invención proporciona procedimientos y composiciones genéticas para la producción de verduras crucíferas comercialmente valiosas que contienen niveles elevados de metabolitos secundarios anticarcinogénicos. La invención contempla además el desarrollo de líneas de brócoli para reproducción con actividad anticarcinogénica incrementada.

La selección de líneas para la reproducción con niveles elevados de compuestos anticarcinogénicos está además facilitada por la utilización de marcadores moleculares para establecer la localización cromosómica de los genes para la biosíntesis de los glucosinolatos y para ayudar en la selección de líneas para retrocruce que contienen la composición genética de mayor utilidad para incrementar el nivel de los compuestos anticarcinogénicos en el brócoli.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para incrementar por procedimientos genéticos los niveles de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinato en las verduras de la especie *Brassica*. Dichos procedimientos incluyen el cruce de especies silvestres de *Brassica* con especies de brócoli, la selección de las líneas con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos y evaluar las propiedades anticarcinogénicas de dichas combinaciones genéticas midiendo la potencia de los extractos de células vegetales para inducir los enzimas de fase II. Se pueden utilizar marcadores RFLP para seleccionar las líneas y cruces que tienen una proporción elevada de fondo genético de brócoli y para establecer la posición de los genes biosintéticos de glucosinato relevantes en el mapa del genoma de *Brassica*.

Los híbridos entre cultivos comerciales de brócoli y las especies silvestres de *B. villosa* y *B. drepanensis* son completamente fértiles y se producen poblaciones de retrocruce. Las líneas de brócoli con niveles incrementados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos y la actividad anticarcinogénica asociada se desarrollan a partir de dichas poblaciones. La eficacia en el desarrollo de dichas líneas aumenta considerablemente gracias a la disponibilidad de marcadores genéticos para seleccionar tanto por el contenido en glucosinato como por el fondo genético deseado.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Modelo genético de la biosíntesis de glucosinolato alifático en *Brassica*.

5 Figura 2. Inducción de la actividad QR (enzimas de fase II) en las células de hepatoma murino Hepa 1c1c7 utilizando extractos del cultivo Marathon y sulforafano sintético (4-metilsulfinilbutil isotiocianato).

10 Figura 3. Efecto de los extractos de *B. drepanensis*; *B. villosa* y *B. atlantica* en la inducción de QR (enzimas de fase II) en células de hepatoma murino Hepa 1c1c7.

Figura 4. El efecto de los extractos del cultivo GD DH y los híbridos recobrados de los cruces con las especies silvestres (GD DH x *B. brassica*); (GD DH x *B. villosa*) y (GD DH x *B. atlantica*), en la inducción de QR (enzimas de fase II) en las células de hepatoma murino Hepa 1c1c7.

15 Figura 5. Perfiles de cromatografía de gases de los glucosinolatos de un extracto derivado del híbrido (GD DH x *B. drepanensis*).

Descripción detallada de la invención

20 El objetivo de la presente invención es proporcionar una verdura comestible del género crucífera con niveles elevados de los compuestos anticarcinogénicos, es decir 4-metilsulfinilbutil isotiocianato y/o 3-metilsulfinilpropil isotiocianato.

25 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar procedimientos para el incremento selectivo de los derivados de glucosinolato anticarcinogénicos en las especies de *Brassica* y proporcionar especies de *Brassica* con niveles incrementados de los derivados de glucosinolatos anticarcinogénicos y en particular verduras comestibles del género *Brassica* con niveles elevados de los derivados de glucosinolato anticarcinogénicos 4-metilsulfinilbutil isotiocianato y/o 3-metilsulfinilpropil isotiocianato.

30 Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar procedimientos para la selección de las combinaciones genéticas de brócoli que contienen niveles elevados de los derivados de glucosinolato anticarcinogénicos y procedimientos para valorar las propiedades anticarcinogénicas de dichas combinaciones genéticas.

35 Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones de materia que comprenden verduras del género *Brassica* con concentraciones de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos de entre 10 y 100 μ moles/g peso seco.

40 Se proporcionan estos y otros objetivos de la presente invención por una o más de las formas de realización que se describen a continuación.

45 La selección de brócoli con niveles elevados de los glucosinolatos anticarcinogénicos no es posible sobre el fondo genético comercial actual utilizado para desarrollar cultivos comerciales de brócoli. Con base en el modelo genético de la biosíntesis de glucosinolatos mostrado en la Figura 1, la producción de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato depende de un número de factores genéticos. Estos incluyen una baja actividad del alelo GSL-ALK y niveles adecuados de la actividad codificada por el alelo GSL-OXID y otros alelos responsables de la producción de los precursores del glucosinolato. Se cree que sabor relativamente suave del brócoli está asociado con niveles relativamente bajos de glucosinolatos en general y en particular de los glucosinolatos volátiles. Esto es evidente cuando se compara el perfil total de glucosinolato del brócoli comercial con el de sus parientes silvestres.

50 Por consiguiente los procedimientos para producir brócoli con las características de sabor y los niveles elevados de glucosinolatos anticarcinogénicos deben comprender la selección de líneas con las combinaciones genéticas apropiadas que no producen glucosinolatos alquenilados con un fuerte sabor. También es deseable mantener un nivel bajo de otros glucosinolatos para evitar la producción de sabores extraños. En consecuencia los procedimientos para lograr el incremento de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos no deben resultar en una producción generalizada de glucosinolatos o a la producción de alquenil glucosinolatos. La presente invención proporciona procedimientos para lograr estos objetivos.

60 En las condiciones normales de campo, se cree que es poco probable que la *B. oleracea* silvestre se cruce con la *B. oleracea* cultivada. Se cree que los caracteres de compatibilidad están inhibidos cuando florecen los cultivos.

La presente invención también contempla la utilización de marcadores genéticos para facilitar la selección de las líneas que contienen las combinaciones genéticas deseadas. La utilización de marcadores RFLP, o de sondas de ADN que se segregan con caracteres específicos es bien conocida en la técnica, sin embargo la presente invención describe sondas específicas que han demostrado ser útiles para la selección de combinaciones genéticas que conducen a niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos en *Brassica oleracea*. Además, el análisis por RFLP proporciona un medio útil para valorar la fracción del genoma de la planta híbrida que proviene del brócoli o de la especie silvestre. En consecuencia la utilización de RFLP o de sondas de ADN encuentra utilidad para la selección rápida de plantas que contienen la proporción deseada de genoma de la especie silvestre y de brócoli. En consecuencia el uso de marcadores de ADN para analizar las plantas híbridas después del cruce del brócoli con la especie silvestre facilita considerablemente la selección de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos que incluye un porcentaje elevado del genoma comercial deseado.

La presente invención también describe procedimientos para valorar las propiedades anticarcinogénicas del brócoli que contiene niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos mediante el ensayo de la inducción de enzimas de fase II. Aunque los efectos anticarcinogénicos a largo plazo de derivados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos específicos no se pueden determinar con precisión y además dependerán de muchos factores adicionales, dietéticos y otros, la utilización del ensayo de inducción proporciona pruebas convincentes de los efectos anticarcinogénicos de los derivados isotiocianato de los glucosinolatos específicos.

En consecuencia la presente invención describe procedimientos que permiten la selección de *Brassica sp.* con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, procedimientos para valorar los efectos anticarcinogénicos de dichas especies vegetales y procedimientos y composiciones que permiten la obtención de líneas de brócoli con propiedades anticarcinogénicas.

En una forma de realización de la presente invención, se utiliza un procedimiento para seleccionar líneas de brócoli con niveles elevados de glucosinolatos específicos que comprende:

- I) Cruzar especies silvestres con líneas de brócoli doblemente haploides para la reproducción;
- II) Analizar los híbridos F1, seleccionando los híbridos con los niveles más elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos y retrocruzar con las líneas de brócoli para la reproducción;
- III) Análisis de los glucosinolatos en plantas individuales de la generación B1 (retrocruce 1);
- IV) Uno o dos ciclos más de retrocruces (B2, B3) con selección de las plantas con los niveles más elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, escrutinio de la capacidad anticarcinogénica de los individuos seleccionados por inducción de los enzimas de fase II;
- V) Análisis de las poblaciones B3 (Retrocruce 3) con selección de las plantas con los niveles más elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, escrutinio anticarcinogénico de los individuos seleccionados por inducción de los enzimas de fase II;
- VI) Selección de una línea de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos portadores de los caracteres anticarcinogénicos capaces de producir una fuerte inducción de los enzimas de fase II.

En consecuencia el procedimiento permite la selección de líneas de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos. Los niveles elevados de dichos glucosinolatos específicos se correlacionan con la propiedad anticarcinogénica por evaluación de la inducción de los enzimas de fase II. Debido al uso de retrocruces, se generan combinaciones genéticas que comprenden el carácter anticarcinogénico en el fondo genético que se encuentra en el brócoli comercial. Consecuentemente se logra la producción de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos en los cultivos comerciales de brócoli, dando lugar a una nueva y valiosa composición de brócoli.

En otra forma de realización de la presente invención, la capacidad anticarcinogénica de las líneas se combina además con alelos específicos de autoincompatibilidad que son útiles para las estrategias en la producción de semilla. Se conoce que ciertas especies de crucíferas son portadoras de múltiples alelos de autoincompatibilidad y dichos alelos se utilizan frecuentemente para la producción de semillas híbridas. De este modo se puede producir un brócoli híbrido portador de las combinaciones genéticas que producen niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos. Otro objetivo de la presente invención es seleccionar líneas de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o

ES 2 179 640 T3

3-metilsulfinilpropil glucosinolatos y una combinación específica de alelos de autoincompatibilidad (SI). En algunos casos, se puede utilizar una sonda molecular para identificar los alelos SI, tal como la sonda pW150 (disponible del Dr. Tom Osborne, Department of Agronomy, University of Wisconsin, Madison, WI, 53706, descrita además en Toroser et al., *Theoretical and Applied Genetics*, 91:802-808 (1995) o el análisis de la propia proteína SI puede proporcionar la selección del alelo SI deseado.

En otra forma de realización de la presente invención, se utiliza un procedimiento para seleccionar líneas de brócoli con niveles elevados de glucosinolatos específicos y alelos SI que comprende:

- I) Cruzar especies silvestres con líneas doble haploides de brócoli para la reproducción que contienen alelos SI específicos;
- II) Analizar los híbridos F1, seleccionando los híbridos con los niveles más elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos y retrocruzando con las líneas de brócoli para la reproducción, escrutinizando los alelos SI con marcadores RFLP, seleccionando los individuos con las combinaciones deseadas de alelos SI contrastantes;
- III) Analizar los glucosinolatos en plantas individuales de la generación B1 (Retrocruce 1);
- IV) Uno o dos ciclos más de retrocruces con selección de las plantas con el nivel más elevado de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, escrutinio de los alelos SI adecuados con marcadores RFLP, escrutinio de la anticarcinogenicidad en los individuos seleccionados por inducción de los enzimas de fase II;
- V) Análisis de la población B3 (Retrocruce 3) con selección de las plantas con el nivel más elevado de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, escrutinio de la anticarcinogenicidad de los individuos seleccionados por inducción de los enzimas de fase II;
- VI) Selección de una línea de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos y los alelos SI adecuados portadora del carácter anticarcinogénico capaz de producir una fuerte inducción de los enzimas de fase II;

En consecuencia se producen líneas de brócoli portadoras alelos SI específicos útiles para hacer cruces en un esquema de producción de semillas híbridas. Consecuentemente por cruce con el padre adecuado se puede producir semilla de brócoli híbrido portadora de combinaciones genéticas para niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos. Dicha semilla es valiosa ya que el brócoli híbrido también es portador de muchas combinaciones genéticas útiles para rendimiento agronómico.

Como otra forma de realización de la presente invención, se describe un procedimiento que utiliza marcadores de ADN que se segregan con perfiles específicos de glucosinolatos. En dicho procedimiento, la utilización de marcadores de ADN, o más específicamente los marcadores conocidos como QTLs (loci de caracteres cuantitativos) se utilizan para seleccionar las combinaciones genéticas del brócoli que conducen a niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos. En particular se describe la utilización de los marcadores conocidos como pW176, pW207 y pW141, localizados en el cromosoma 2 y los marcadores conocidos como pW224, pW114, pW145, pW123, pW138, pW197, pW228, pW106 localizados en el cromosoma 5 (disponibles del Dr. Tom Osborne, Department of Agronomy, University of Wisconsin, Madison, WI, 53706 y descritos en Toroser et al., *Theoretical and Applied Genetics*, 91:802-808 (1995) y se descritos en Ferreira et al., *Theoretical and applied Genetics*, 89:615-621 (1994).

Se ha encontrado que dos regiones del genoma (encontradas en los cromosomas 2 y 5) de *Brassica oleracea* silvestre son necesarias para la expresión de niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos. La utilización de los marcadores facilita considerablemente la selección de las líneas de los híbridos y los retrocruces entre el brócoli y las especies silvestres que contienen las combinaciones genéticas responsables de la producción de niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos. Además, se ha encontrado que el QTL localizado en el cromosoma 5 regula específicamente los niveles de 3-metilsulfinilpropil glucosinolato y tiene poco efecto en los niveles de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato. En consecuencia es posible manipular los niveles de 3-metilsulfinilpropil glucosinolato y de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato independientemente utilizando sondas moleculares además de la simple selección de líneas.

ES 2 179 640 T3

En consecuencia en esta forma de realización de la presente invención se describe un procedimiento para la producción de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos que comprende:

- I) Cruzar la especie silvestre con líneas de brócoli doble haploide para la reproducción;
- II) Analizar los híbridos F1 y seleccionar los híbridos con los niveles más elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos por escrutinio con sondas RFLP asociadas a la producción de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos y retrocruce de las líneas seleccionadas con las líneas de brócoli para la reproducción;
- III) Análisis de los glucosinolatos en plantas individuales de la generación B1 (Retrocruce 1);
- IV) Uno o dos ciclos más de retrocruces con selección de las plantas con los niveles más elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos por escrutinio con sondas de RFLP asociadas a la producción de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, escrutinio de la anticarcinogenicidad de los individuos seleccionados por inducción de los enzimas de fase II;
- V) Análisis de la población B3 (Retrocruce 3) con selección de las plantas con los niveles más elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos por escrutinio con sondas de RFLP asociadas a la producción de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos y análisis de los perfiles de glucosinolatos, escrutinio de la anticarcinogenicidad de los individuos seleccionados por inducción de los enzimas de fase II;
- VI) Selección de una línea de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos portadora del carácter anticarcinogénico capaz de causar una inducción fuerte de los enzimas de fase II.

En consecuencia la utilización de las sondas de RFLP para identificar las regiones específicas del genoma de *Brassica oleracea* silvestre (p.ej. los denominados QTLs) responsables de la producción de niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos facilita considerablemente la producción de brócoli comestible con propiedades anticarcinogénicas.

Las anteriores formas de realización permiten la selección de líneas de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, preferiblemente brócoli con una composición que comprende concentraciones de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos entre 10 y 100 μ moles/g de peso seco. Además, las formas de realización anteriores permiten la selección de líneas de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos capaces de producir un incremento de 10 a 100 veces en la inducción de los enzimas de fase II en comparación con los cultivos de brócoli utilizados comúnmente en el comercio.

Los expertos en la técnica contemplarán que los procedimientos descritos en la presente memoria también se pueden utilizar para obtener otras hortalizas crucíferas *B. oleracea* además del brócoli, incluyendo el repollo tales como el repollo blanco, repollo verde tal como el Savoy, coliflor, coles de Bruselas, col rizada, kolrabi y semejantes. Se contempla además que el "rutabaga" (*B. napus*) y el nabo (*B. rapa*) también se pueden manipular según el procedimiento y las combinaciones genéticas de la presente invención.

Los ejemplos siguientes ilustran el procedimiento pero no limitan en ningún modo el ámbito de la invención.

Ejemplo 1

Procedimientos para la medición del contenido en glucosinolatos en especies silvestres y comerciales de la especie Brassica e híbridos de estas

Una línea doble haploide de brócoli para la reproducción derivada del cultivo Green Duke (referido como GD DH; Bouhuon, E. J. R., Keith, D. J., Parkin, I. A. P., Sharpe, A. G., and Lydiate, D. J., (1996) *Theor. Appl. Genet.*, 93:833-839, tres cultivos comerciales (Trixie, Green Comet y Marathon) y tres especies silvestres de *Brassica*: *B. drepanesis* Caruel (sin. *B. villosa* Biv. subsp. *drepanensis*), *B. villosa* Biv. y *B. atlántica* (coss.) O. E. Schultz, fueron cultivadas en un invernadero en condiciones estándar tal como se describió previamente (Magrath, R., Herron, C., Giamoustaris, A. and Mithen, R., (1993) *Pant Breed.*, 111:55-72). Se cruzó cada una de las especies silvestres con la línea para reproducción GD DH, se obtuvieron semillas F₁ y se cultivaron en condiciones estándar. El 11 de Febrero, 1999 se hizo

un depósito de las semillas del cultivo derivado de GD DH en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) en Aberdeen, Escocia y se asignó al depósito el n° NCIMB 41008. Después de 8 -12 semanas se cosecharon las inflorescencias de los cultivos y de las de los híbridos después de 12 a 16 semanas, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se liofilizaron. El sulforafano sintético fue generosamente proporcionado por el profesor P. Talalay, The John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD.

Se extrajeron los glucosinolatos del material liofilizado, se convirtieron en desulfoglucosinolatos y se analizaron por HPLC tal como se describió previamente (Magrath, R., Herron, C., Giamoustaris, A., and Mithen, R., (1993) *Plant Breed.*, 111:55-72) utilizando como estándar interno benzil glucosinolato.

Los extractos del material liofilizado se valoraron para determinar su actividad inductora en células del hepatoma murino Hepa 1c1c7. Se humedecieron aproximadamente 0,1 g de material liofilizado molido añadiendo agua (2 ml), se homogeneizó y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora con mezclado ocasional. Se añadieron 3 ml de metanol caliente al 70% (vol/vol) y se mezcló a completamente antes de incubar a durante 15 minutos a 70°C. Se enfriaron los homogeneizados a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 r.p.m. Se recogieron los sobrenadantes y se redujo el volumen hasta un quinto del volumen inicial en una centrifuga al vacío. Los concentrados resultantes se filtraron a través de un filtro estéril no pirogénico (0,22 µm) y se guardaron a -70°C antes de ser ensayados. La concentraciones de cada extracto se expresaron como peso seco del material original por ml de medio de cultivo.

La inducción se midió según el procedimientos publicados (Tawfiq, N., Heaney, R. K., Plumb, J. A., Fenwick, G. R., Musk, S. R. R., and Williamson, G., (1995) *Carcinogenesis*, 16:1191-1194, Prochaska, H. J., and Santamaría, A. B., (1988) *Anal. Biochem.* 169:328-336, Williamson, G., Plumb, G. W., Uda, Y., Price, K. R., and Rhodes, M. J. C., (1996) *Carcinogenesis*, 17:2385-2387) con las siguientes modificaciones. Cada muestra fue analizada a ocho concentraciones utilizando cuatro réplicas por cada concentración. Se utilizó b-naftoflavona como control positivo a una concentración de 0,2 mM. Esto típicamente produjo una inducción de tres veces (CD; 0,02 mM) y fue comparable a determinaciones anteriores. Cada cultivo/híbrido fue extraído en tres ocasiones y se analizó por separado.

Los componentes no volátiles y volátiles de los productos de degradación hidrolítica de los cultivos, de las especies silvestres y de los híbridos fueron analizados por GC-MS utilizando una HP Chemstation GP800A equipada con una columna HP1 de metilsilano entrelazado de 30 m x 0,25 mm (Hewlett Packard Co. Palo Alto, CA. USA). Típicamente, la columna se calentó desde 60°C hasta 250°C a 20°C/min y el barrido del espectrograma de masas fue desde 35 hasta 250 m/z.

Se humedecieron en agua aproximadamente 0,1 g del material liofilizado, se mezcló exhaustivamente y se incubó durante 1 hora con mezclado ocasional. Los productos de hidrólisis no volátiles se extrajeron de las muestras con cloruro de metileno y se filtraron antes del análisis. Para analizar los productos volátiles, se humedeció en agua (0,5 ml) el material liofilizado (0,1 g), se selló el vial de vidrio inmediatamente y los productos volátiles se recogieron del espacio superior del vial con un una sonda de extracción de matriz de fase sólida (SPME) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA).

45 Ejemplo 2

Contenido en glucosinolato de las líneas de Brassica

La Tabla 1 a continuación, muestra los contenidos en glucosinolato de los cultivos comerciales de brócoli Green Comet, Marathon y Trixie, la especie *B. oleracea* silvestre y los híbridos entre una líneas doble haploide del cultivo comercial Green Duke y las especies silvestres de Brassica.

55

60

TABLA 1

Contenido individual y total en glucosinato alifático ($\mu\text{moles/g}$ materia seca ± 1 error estándar) de los cultivos de brócoli, especies silvestres de *Brassica* e híbridos producto de los cruces entre GD DH y las especies silvestres de *Brassica*

5

10

15

20

	MSP*	MSB	PROP	BUT	MTP	OH-BUT	Total
Gree Comet	0,1 \pm 0,1	0,8 \pm 0,5	0,2 \pm 0,1	0,0	2,7 \pm 0,5	0,5 \pm 0,3	4,3 \pm 0,5
GD DH	0,2 \pm 0,2	4,6 \pm 1,1	0,0	0,0	2,3 \pm 0,6	0,0	7,1 \pm 1,1
Marathon	1,0 \pm 0,3	5,4 \pm 1,1	0,2 \pm 0,1	0,0	4,1 \pm 0,7	0,0	10,7 \pm 1,8
Trixie	0,4 \pm 0,2	11,1 \pm 2,1	0,2 \pm 0,1	0,0	4,9 \pm 1,2	0,0	16,6 \pm 2,6
<i>B. atlantica</i>	0,9 \pm 0,7	0,0	92,8 \pm 25,4	0,5 \pm 0,3	1,1 \pm 1,0	0,0	95,3 \pm 26,6
<i>B. drepanensis</i>	11,0 \pm 1,7	0,0	0,0	0,0	51,6 \pm 9,3	0,0	62,6 \pm 10,9
<i>B. villosa</i>	119 \pm 18	1,4 \pm 0,2	0,0	0,1 \pm 0,1	3,4 \pm 0,9	0,1 \pm 0,1	124 \pm 19
GD ¹ x <i>B. atlantica</i>	2,2 \pm 0,8	5,3 \pm 1,4	76,9 \pm 20,8	23,6 \pm 6,3	2,0 \pm 0,7	43,7 \pm 6,7	154 \pm 30
GDx <i>B. drepanensis</i>	26,2 \pm 2,9	76,5 \pm 8,9	0,0	0,0	1,9 \pm 0,4	0,0	105 \pm 12
GDx <i>B. villosa</i>	26,4 \pm 2,7	81,8 \pm 5,0	0,0	0,0	1,0 \pm 0,3	0,0	109 \pm 7

*MSP: 3-metilsulfinilpropil, MSB: 4-metilsulfinilbutil, PROP: 2-propenil, BUT: 3-butenil, MTP: 3-metiltiopropil, OH-BUT: 2-hidroxi-3-butenil, ¹ GD: GD DH

25

30

35

Los niveles de 4-metilsulfinilbutil glucosinatos en los cultivos de brócoli fueron semejantes a los previamente reportados (Carlson, D. G., Daxenbichler, M. E., van Etten, C. H., Kwolek, W. F., and Williams, P. H., (1987) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112:173-178). Las especies silvestres tuvieron aproximadamente un nivel diez veces superior de glucosinatos alifáticos que los cultivos. *B. villosa*, *B. drepanensis* y *B. atlántica* tuvieron predominantemente 3-metilsulfinilpropil, 3-metiltiopropil y 2-propenil glucosinatos. Las diferencias en perfiles de glucosinato se atribuyeron a diferencias en los alelos en el locus de la GSL-OXID y de la GSL-ALK (Giamoustaris, A. and Mithen, R. (1996) *Theor. Appl. Genet.*, 93:1006-1010). En los híbridos de [GD DH x *B. drepanensis*] y [GD DH x *B. villosa*] el 4-metilsulfinilbutil fue el glucosinato más abundante debido a la naturaleza dominante de los alelos GSL-ELONG y GSL-OXID que se encuentran en GD DH y al alelo nulo de GSL-ALK en ambos padres. En el híbrido [GD DH x *B. atlántica*], el 3-butenil glucosinato fue el glucosinato predominante. El 2-hidroxi-3-butenil glicosinato también se encontró debido a la acción de un alelo GSL-OH funcional que se encuentra en la línea GD DH (observación no publicada), que normalmente no es evidente debido a que el alelo nulo GSL-ALK evita la biosíntesis de 3-butenil glucosinato.

40

Ejemplo 3

Inducción de los enzimas de fase II

45

50

Se utilizó sulforafano sintético como control positivo para cuantificar la inducción de QR en células Hepa 1c1c7. Fue un inductor potente y produjo una inducción de 3 veces a 1,6 mM (CD; 0,4 mM), comparable con determinaciones anteriores. No se observó citotoxicidad en ninguna de las muestras ni a ninguna de las concentraciones ensayadas. Los extractos de todos los cultivos fueron inductores débiles en el rango de concentraciones de 0,001 mg/ml a 0,125 mg/ml. Sin embargo, la inducción fue menor que la esperada si el 100% de los glucosinatos se hubiesen convertido en isotiocianatos y no en otros productos tales como tiocianatos o derivados de nitrilo (Fenwick, G. R., Heaney, R. K., and Mullin, W. J., (1983) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 18:123-201).

55

Por ejemplo, Marathon contuvo 5,4 mmoles de 4-metilsulfinilbutil glucosinato/g de materia seca (Tabla 1).

60

En consecuencia, un extracto que contiene 75 mg/ml de Marathon se esperaría que tuviese una concentración de 4-metilsulfinilbutil isotiocianatos 0,4 mM que podría resultar en una inducción de dos veces. Sin embargo, no se observó una inducción significativa a dicha concentración. Desde luego, se necesitaron 2,5 mg/ml de extracto de Marathon para una inducción de dos veces, que si se convirtiese el 100% de los glucosinatos a isotiocianatos, habría sido equivalente a 13,5 mM de 4-metilsulfinilbutil isotiocianato. En consecuencia, o se ha convertido solo una pequeña proporción del glucosinato en 4-metilsulfinilbutil isotiocianato o la inducción de la actividad QR se redujo debido a la presencia de otros componentes en

el extracto vegetal.

Para determinar la presencia de un inhibidor, un extracto de Marathon (0,125 mg/ml) fue mezclado con sulforafano sintético antes de ser aplicado a las células Hepa 1c1c7. La inducción observada fue similar a la del sulforafano puro por si solo (Figura 2), lo que demostró que no se produjeron efectos inhibidores debidos a otros componentes del extracto. En la Figura 2, se muestra la inducción de QR en las células Hepa 1c1c7 utilizando sulforafano (Δ); extracto de Marathon (0,125 mg/ml) con sulforafano añadido (\blacksquare) o extracto de Marathon (0,001 mg/ml a 0,125 mg/ml), (\circ). La concentración estimada de isotiocianato del extracto de Marathon está basada en el supuesto de que el 100% del glucosinolato parental se convierte en isotiocianato. Por consiguiente, el extracto de Marathon (1 mg/ml) es equivalente a 5,4 μ M de 4-metilsulfinilbutil isotiocianato. Los resultados de Marathon (0,125 mg/ml) con sulforafano añadido se ha indicado gráficamente solo con respecto a la concentración de sulforafano sintético añadido, ya que el extracto de Marathon solo no tiene un efecto significativo sobre la inducción de actividad. En consecuencia, es posible que en Marathon (y también en otros cultivos) solamente una fracción del glucosinolato haya sido convertida en isotiocianato.

Los extractos de *B. villosa* y de *B. drepanensis* fueron potentes inductores de la actividad QR. Por el contrario, los extractos de *B. atlántica* no indujeron al actividad QR, a pesar del elevado contenido en glucosinolato (Figura 3). En la Figura 3, se muestran los efectos de los extractos de: *B. drepanensis* (\blacksquare); *B. villosa* (\blacklozenge) y *B. atlántica* (\square) sobre la inducción de QR en las células de hepatoma murino Hepa 1c1c7. Si asume que el 100% de los glucosinolatos en dichas taxas ha sido convertido en isotiocianato y no en otros productos de degradación hidrolítica posibles (tiocianato y derivados de nitrilo), los valores CD aparentes para el 3-metiltiopropil isotiocianato y 3-metilsulfinilpropil isotiocianato son 1,6 mM y 0,5 mM respectivamente. Dichos valores son ambos inferiores a los reportados para los isotiocianatos sintéticos a 3,5 mM y 2,4 mM, tal como se ilustra en la Tabla 2. Desde luego, si se hubiese convertido menos del glucosinolato a isotiocianato el valor CD aparente habría sido todavía inferior. La Tabla 2 a continuación, ilustra la inducción por los extractos vegetales de actividad QR (enzimas de fase II) en las células Hepa 1c1c7.

TABLA 2

Potencia de la inducción de QR en células murinas Hepa 1c1c7 por los extractos vegetales

	Isotiocianato Predominante	Valor CD aparente* (μ M)	Valor CD para el isotiocianato sintético (μ M) (ver Zhang (2))
<i>B. drepanensis</i>	3-metiltiopropil	1,6 ⁺	3,5
<i>B. villosa</i>	3-metilsulfinilpropil	0,5 ⁺	2,4
GD [↓] x <i>B. drepanesis</i>	4-metilsulfinilbutil	0,3 ⁺	0,4 - 0,8
GD x <i>B. villosa</i>	4-metilsulfinilbutil	0,3 ⁺	0,4 - 0,8
Sulforafano sintético	4-metilsulfinilbutil	0,3	0,4 - 0,8 ^{&}

* Valo CD: concentración del glucosinolato parental necesaria para duplicar la actividad inductora de QR. ⁺ Los valores indicados se calcularon asumiendo una conversión del 100% de los glucosinolatos parentales a los isotiocianatos correspondientes. [↓] GD: GD DH.

[&] Otros estudios han indicado un valor CD de 0,2 μ M. Ver Prochaska (10).

La diferencia en potencia podría ser consecuencia de diferencias químicas entre los isotiocianatos naturales y sintéticos (p.ej. la naturaleza de los estereo isómeros) o de otros factores en los extractos de las plantas que podrían incluir efectos sinérgicos debidos a niveles bajos de otros isotiocianatos. La falta de actividad de los extractos de *B. atlántica* acentúa la importancia de la estructura de las cadenas laterales de los glucosinolatos.

Tanto los extractos de [GD DH x *B. villosa*] como los de [GD DH x *B. drepanensis*] fueron inductores potentes de la actividad QR (Figura 4). En la Figura 4, se muestran los efectos de los extractos del cultivo GD DH (\bullet); y de los cruces híbridos [GD DH x *B. drepanensis*] (\blacksquare); [GD DH x *B. villosa*] (\blacklozenge) y [GD DH x *B. atlántica*] (Δ); en la inducción de QR en las células del hepatoma murino Hepa 1c1c7.

ES 2 179 640 T3

Con base en una conversión del 100% de los glucosinolatos a isotiocianatos, los valores aparentes de CD de ambos extractos fueron de 0,3 mM (equivalente de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato), lo que es similar al del sulforafano puro (anterior) y al reportado en estudios anteriores. En consecuencia, mientras que hubo un aumento de aproximadamente 10 veces en el nivel de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato en [GD DH x *B. villosa*] y [GD DH x *B. drepanensis*] en comparación con Marathon y GD DH, hubo una diferencia de mas de 100 veces en la capacidad para inducir actividad QR (es decir, hace falta por lo menos una cantidad 100 veces superior de tejido de Marathon para inducir una actividad QR equivalente en comparación con los híbridos GD DH).

Para examinar la composición y la naturaleza de los productos de hidrólisis, se analizaron los extractos por GC-MS (Figura 5). En la Figura 5, se muestra el perfil de cromatografía de gases de un extracto de [GD DH x *B. drepanensis*]. La espectroscopia de masas confirmó los picos como (1), 3-metilsulfinilpropil nitrilo; (2), 4-metilsulfinilbutil nitrilo; (3), 3-metilsulfinilpropil isotiocianato; (4), 4-metilsulfinilbutil isotiocianato. La hidratación del las hojas liofilizadas de *B. drepanensis* y *B. atlántica* condujo a la producción de grandes cantidades de 3-metiltiopropil y 2-propenil isotiocianatos volátiles. Se detecto 3-metilsulfinilpropil isotiocianato en los extractos cloruro de metileno de *B. villosa*, lo que fue consistente con los perfiles de glucosinolato. En los extractos de [GD DH x *B. villosa*] y [GD DH x *B. drepanensis*], el isotiocianato dominante fue 4-metilsulfinilbutil isotiocianato tal como se esperaba. También se detectaron niveles relativamente bajos de 3-metilsulfinilpropil isotiocianato y los derivados nitrilo. Por el contrario, en los cultivos solamente se encontraron trazas de 4-metilsulfinilbutil isotiocianato. Esto indica que la diferencia de 100 veces en la capacidad para inducir actividad QR entre los dos híbridos y los cultivos se debe tanto al aumento en 4-metilsulfinilbutil glucosinolato como a la mayor conversión a isotiocianato.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de *Brassica oleracea* con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos, o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o ambos, que comprende:

- 5 (a) cruzar especies silvestres de *Brassica oleracea* con líneas de *Brassica oleracea* para la reproducción; y,
- 10 (b) seleccionar los híbridos con niveles de 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o ambos, por encima de los inicialmente encontrados en las líneas para la reproducción de *Brassica oleracea*.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, que además comprende:

- 15 (c) retrocruzar con las líneas de brócoli para la reproducción; y,
- 15 (d) seleccionar las plantas con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o ambos; en el que las líneas de *Brassica oleracea* para la reproducción son líneas de brócoli para la reproducción.

20 3. Procedimiento según la reivindicación 2, que además comprende:

- 20 (e) seleccionar una línea de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o ambos, capaz de producir una fuerte inducción de los enzimas de fase II.

25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, que además comprende:

- (c) escrutar para los alelos SI específicos con marcadores RFLP;

30 en el que las líneas de *Brassica oleracea* para la reproducción son líneas de brócoli doble haploide para la reproducción que contienen alelos SI específicos.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, que además comprende:

- 35 (c) retrocruzar y seleccionar las plantas que tienen niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos o ambos;
- (d) escrutar para los alelos SI específicos con marcadores RFLP; y
- 40 (e) seleccionar una línea de brócoli que tiene niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos o ambos, y los alelos SI adecuados que es capaz de causar una fuerte inducción de los enzimas de fase II;

en el que las líneas para la reproducción de *Brassica oleracea* son líneas de brócoli doble haploide para la reproducción que contienen alelos SI específicos.

45 6. Procedimiento según la reivindicación 1, que además comprende:

- 50 (c) retrocruzar y seleccionar plantas que contienen la combinación genética que codifica la expresión de niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos o ambos; y,
- (d) seleccionar una línea de brócoli con niveles elevados de 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o ambos, que es capaz de producir una fuerte inducción de los enzimas de fase II;

55 en el que las líneas para la reproducción de *Brassica oleracea* son líneas de brócoli doble haploide para la reproducción y se utilizan sondas de ADN para seleccionar los híbridos con una combinación genética que codifica la expresión de niveles elevados de 4-metilsulfinobutil glucosinolatos o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o ambos.

60 7. Procedimiento según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 6, en el que solamente está elevado el 4-metilsulfinilbutil glucosinato.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que solamente está elevado el 3-metilsulfinilpropil glucosinolato.

9. Planta de *Brassica* comestible producida según el procedimiento previsto en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

10. Porción comestible de una planta de brócoli producida según el procedimiento previsto en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

11. Semilla de una planta de brócoli producida según el procedimiento previsto en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

12. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que las sondas de ADN utilizadas se seleccionan de entre el grupo que comprende: pW176, pW141, pW207, pW224, pW114, pW145, pW123, pW138, pW197, pW228 y pW106.

13. Planta de brócoli que tiene niveles elevados de 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos o 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o ambos; en la que la planta de brócoli es una planta híbrida después de cruzar líneas de brócoli para la reproducción con especies silvestres y, los niveles de 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos o ambos, están elevados por enzima de los iniciales que se encuentran en las líneas de brócoli para la reproducción.

14. Planta de brócoli según la reivindicación 13, en la que las concentraciones de 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o ambas, están comprendidas entre 10 y 100 μ moles por gramo en peso seco.

15. Inflorescencia de brócoli que tiene niveles elevados de 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o ambos; en la que la inflorescencia de brócoli se obtiene a partir de una planta híbrida después del cruce de líneas de brócoli para la reproducción con especies silvestres y los niveles de 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos o ambos, son más elevados que los que inicialmente se encuentran en las líneas de brócoli para la reproducción.

16. Inflorescencia de brócoli según la reivindicación 15, en la que la concentración de 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o ambos, está comprendida entre 10 y 100 μ moles por gramo en peso seco.

17. Célula de planta de *Brassica* que tiene niveles elevados de 3-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos o ambos; en la que la célula de planta de *Brassica* se obtiene a partir de una planta híbrida después de cruzar líneas de brócoli para la reproducción con especies silvestres y los niveles de 4-metilsulfinilpropil glucosinolatos, o 3-metilsulfinilbutil glucosinolatos o ambos son superiores a los niveles que inicialmente se encuentran en las líneas de brócoli para la reproducción.

18. Célula de planta según la reivindicación 17, en la que la célula es una célula de inflorescencia.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

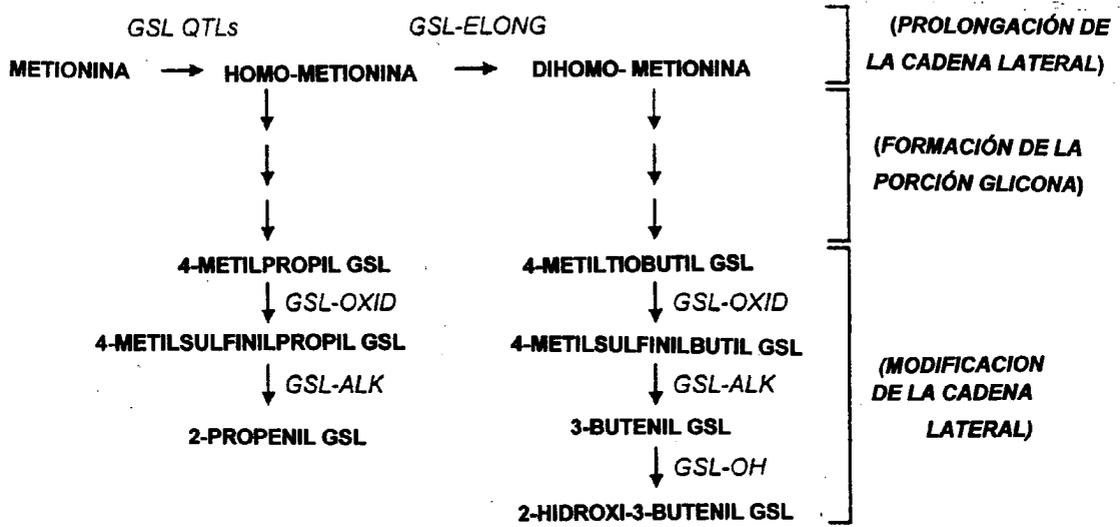


FIG. 1

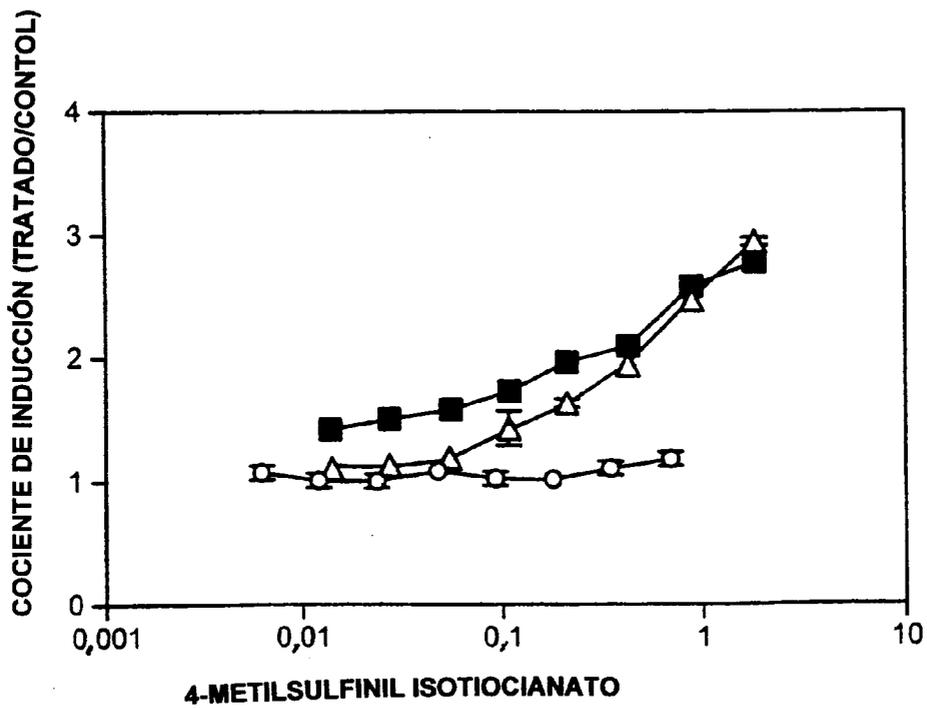


FIG. 2

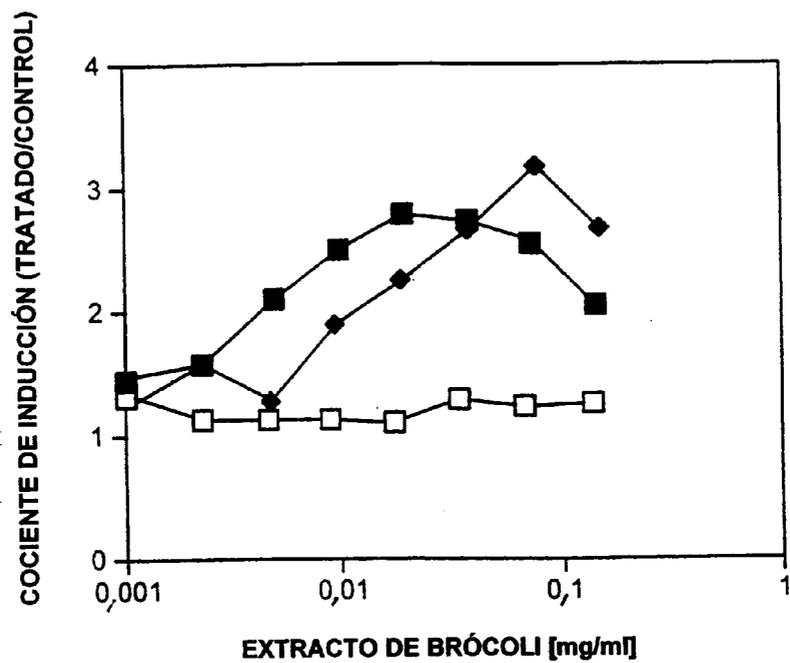


FIG. 3

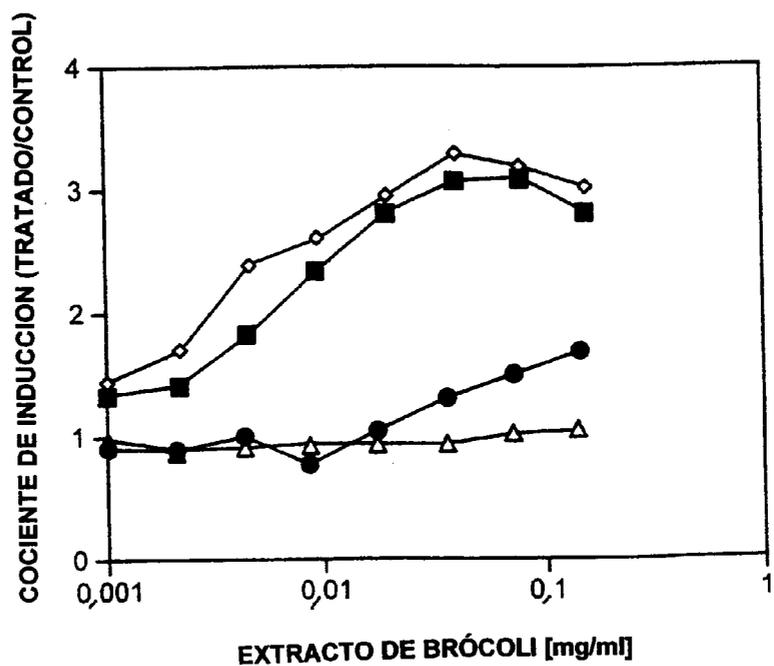


FIG. 4

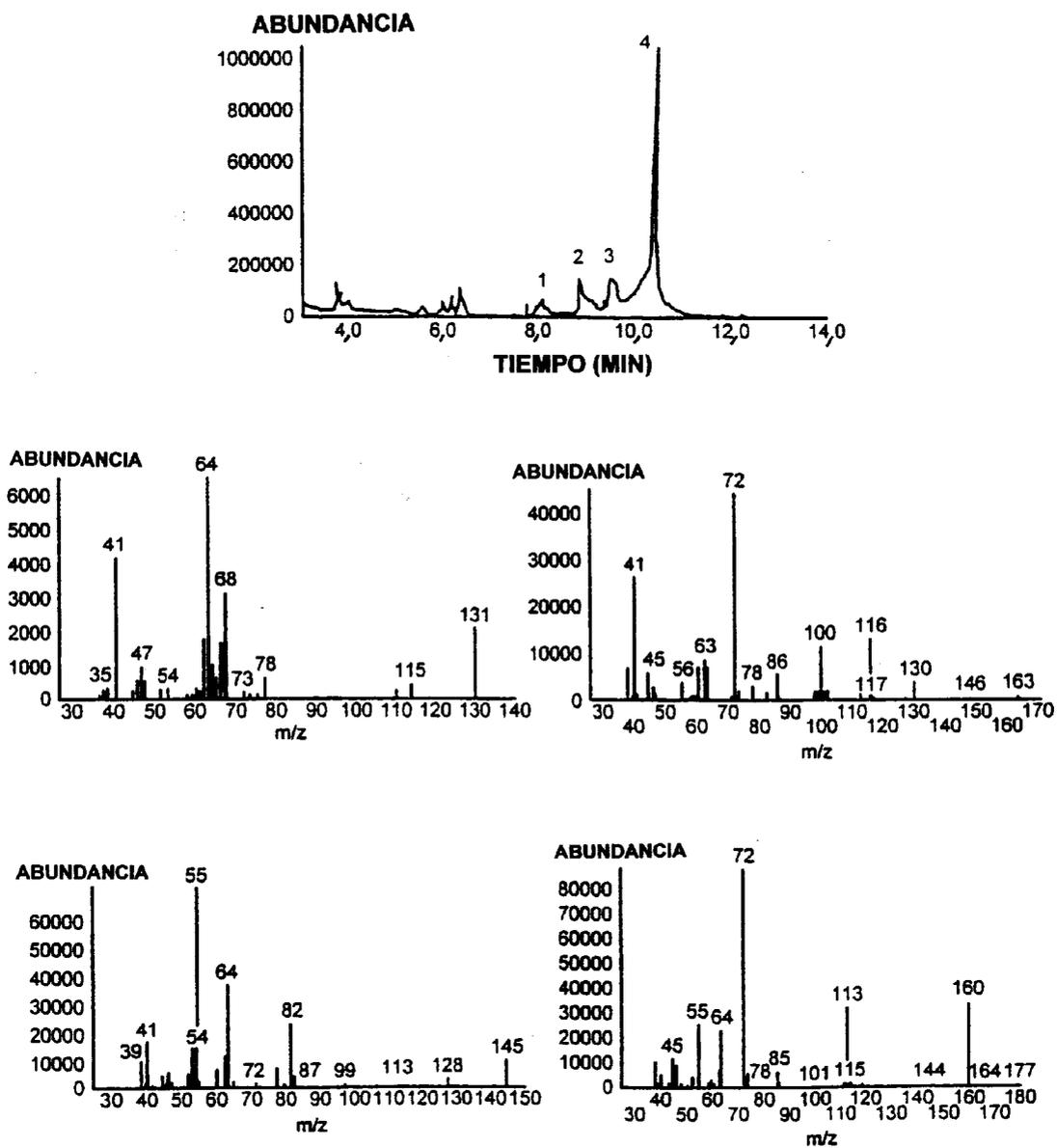


FIG. 5