

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 037**

51 Int. Cl.:

**A01H 1/04** (2006.01)

**A01H 5/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2007 E 07702705 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 1988764**

54 Título: **Método de cribado para la selección de plantas que muestran una reducida decoloración de superficie inducida por herida**

30 Prioridad:

**06.01.2006 EP 06075039**

**17.03.2006 EP 06075645**

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

**13.12.2013**

73 Titular/es:

**RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.  
(100.0%)  
BURGEMEESTER CREZEELAAN 40  
2678 KX DE LIER, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DUN, CORNELIS, MARIA, PETRUS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 434 037 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Método de cribado para la selección de plantas que muestran una reducida decoloración de superficie inducida por herida

*Campo de la invención.*

5 La presente invención se refiere a un método para el cribado de una población de plantas o partes de plantas en relación con la presencia en las mismas de individuos que muestran una decoloración de superficie inducida por herida, en comparación con una planta testigo o una parte de una planta.

*Fundamentos de la invención.*

10 Debido al crecimiento de la demanda, el procesamiento de productos frescos tal como la lechuga, achicoria, endibias y otras verduras, se ha expandido de una forma considerable en los últimos años. La recolección y el procesamiento de verduras de hoja verde implica un corte extenso de las hojas, lo que induce una fuerte respuesta a la herida. Esta respuesta a la herida lleva a un rápido deterioro del producto procesado. Este deterioro se manifiesta por una decoloración debida al pardeamiento (*browning*) o enrojecimiento (*pinking*) enzimático en la superficie de la herida y alrededor de la misma, la respiración y la desecación debidas a la transpiración. Especialmente el  
15 pardeamiento o enrojecimiento enzimático se considera de gran importancia, determinando directa o indirectamente la calidad global de las verduras de hoja verde como la lechuga y la achicoria, recién cortadas y envasadas.

Además, como consecuencia del deterioro, puede aumentar significativamente el número de microorganismos, lo que puede comprometer la seguridad alimentaria. La naturaleza altamente perecedera de las lechugas procesadas conduce a una intensa percepción por el consumidor de defectos del color, olor y de la textura, que está  
20 obstaculizando un crecimiento más rápido que el actual del llamado mercado de conveniencia.

Otras verduras como las patatas, los champiñones, el apionabo, las alcachofas y las berenjenas, pero también los frutos y las flores, pueden verse sometidas a una desfavorable decoloración. Por ejemplo, las frutas como las  
25 bananas, manzanas, peras, aguacates, mangos, melocotones y albaricoques, etc., se ponen de color marrón rápidamente cuando se cortan en rodajas o se pelan. Se han de tomar medidas cuando se ofertan estas frutas en forma procesada, tal como en rodajas, en dados, peladas o en macedonia.

Los tallos de flores cortadas, por ejemplo de gerbera o crisantemo, pueden ser también propensos a una decoloración, que es indeseable desde el punto de vista comercial, porque las decoloraciones están consideradas como no atractivas para el consumidor, reduciendo así las posibilidades de comercialización.

30 Con el fin de inhibir el proceso de deterioro en verduras tales como la lechuga, se han desarrollado muchos tratamientos químicos o físicos posteriores a la recolección que se pueden aplicar para desacelerar el deterioro de la lechuga procesada.

Entre estos tratamientos se encuentran el envasado de las verduras recién cortadas bajo una atmósfera modificada, la aplicación de recubrimientos comestibles, el tratamiento de choque térmico y la adición de productos químicos, que inhiben el pardeamiento enzimático.

35 Cuando se envasa lechuga recién cortada bajo una atmósfera de oxígeno reducido a bajas temperaturas, se puede reducir sustancialmente el pardeamiento enzimático. Sin embargo, tal ambiente modificado bajo en oxígeno da lugar a una respiración anaerobia, que crea un mal sabor y mal olor de los productos, que se perciben como muy poco atractivos.

40 Los recubrimientos comestibles son capas delgadas de materiales, que actúan como barrera de aislamiento físico y que protegen eficazmente al producto frente a diferentes formas de deterioro tales como la evaporación y el pardeamiento. Estos recubrimientos pueden hacerse por ejemplo de resinas, polisacáridos o proteínas.

Se ha demostrado además que el pardeamiento de la lechuga recién cortada se puede impedir aplicando un breve choque térmico de 90 segundos a 45 °C, inmediatamente después del procesamiento. Posiblemente, el choque  
45 térmico desvía la biosíntesis de las enzimas implicadas en la decoloración hacia proteínas de choque térmico, reduciendo así la capacidad de pardeamiento enzimático. Alternativamente, el efecto del tratamiento de choque térmico sobre el pardeamiento puede explicarse por la termosensibilidad de las enzimas implicadas en la ruta de decoloración.

Los productos químicos que pueden aplicarse pueden ser por ejemplo agentes reductores como la vitamina C, agentes quelantes como el EDTA, agentes complejantes como la ciclodextrina e inhibidores enzimáticos como la L-  
50 cisteína. La aplicación de productos químicos en alimentos frescos plantea evidentemente cuestiones de seguridad

alimentaria y requiere la aprobación de la administración. Las combinaciones de las tecnologías posteriores a la recolección descritas anteriormente pueden ser consideradas pensadas y, finalmente, el procedimiento aplicado es un compromiso entre la eficacia tecnológica, el coste y la seguridad alimentaria.

- 5 Al margen de la tecnología aplicada, la mejora de la calidad posterior a la recolección de las verduras, frutas y flores procesadas tendrá un coste y por lo tanto existe en la técnica una evidente necesidad de proporcionar alternativas que eliminen o reduzcan la necesidad de aplicar tecnologías físicas o químicas posteriores a la recolección.

*Sumario de la invención.*

10 El objeto de la presente invención es proporcionar un método de cribado para seleccionar plantas que muestren una reducida respuesta de decoloración inducida por herida para proporcionar plantas y progenie derivadas de las mismas que sean resistentes a los trastornos por el procesamiento posterior a la recolección, tales como el pardeamiento o el enrojecimiento enzimáticos. La decoloración al ser heridas puede ser también visible en partes de las plantas tales como tallos, semillas, frutas, hojas, flores, tubérculos, brotes, etc. Así pues es otro objeto de la presente invención proporcionar un método de cribado para seleccionar plantas que muestren una reducida respuesta de decoloración inducida por herida en sus diversas partes.

15 La invención proporciona por tanto un método para el cribado de una población de plantas o partes de plantas en relación con la presencia en la misma de individuos que muestran una decoloración reducida en comparación con una planta de control o testigo, el cual método comprende:

- a) proporcionar una población de plantas o partes de las plantas entre la población;
  - b) incubar la planta o partes de la planta que tienen una superficie herida creada en la misma en un entorno acuoso, para permitir que tenga lugar la decoloración en las mismas o sobre las mismas;
  - d) observar la decoloración en o sobre las plantas o partes de las plantas;
  - e) comparar la decoloración observada con la decoloración que se observa en la planta o parte de la planta testigo para identificar las plantas o partes de plantas que no muestran decoloración o que muestran una decoloración que es reducida en comparación con la planta o parte de la planta testigo, en donde la planta o partes de la planta usadas en el cribado son un material vegetal joven.
- 25

30 El método de la presente invención tiene dos realizaciones principales. En la primera realización la decoloración es el resultado de la conversión de un sustrato endógeno. Tal decoloración surgirá espontáneamente al tener lugar la incubación de la planta o parte de la planta en un cierto entorno durante un determinado periodo de tiempo. La decoloración en este caso es inducida por herida. La invención se refiere en particular a las reacciones enzimáticas de enrojecimiento y pardeamiento por causas naturales. El método de cribado de la presente invención está destinado a identificar plantas que no muestren esta reacción o que muestren una reacción reducida en comparación con el testigo.

35 En la segunda realización la decoloración es provocada por la conversión de un sustrato añadido de forma exógena que puede ser convertido en un sustrato coloreado que se hace visible cuando tiene lugar la reacción en la planta. Tal reacción de color puede ser o no inducida por herida. Tiene lugar también por ejemplo en los tegumentos de las semillas intactas. El método de cribado de la presente invención está destinado a identificar plantas que no muestren esta reacción o que muestren una reacción reducida en comparación con un testigo.

40 La última realización se refiere más en particular a un método para cribar una población de plantas o partes de plantas en relación con la presencia en la misma de individuos que muestran una decoloración reducida en comparación con una planta testigo, el cual método comprende:

- a) proporcionar una población de plantas o partes de las plantas entre la población;
  - b) incubar la planta o partes de la planta con un sustrato que puede ser convertido en un pigmento coloreado para permitir que la decoloración ocurra en o sobre las mismas;
  - c) observar la decoloración en o sobre las plantas o partes de las plantas;
  - d) comparar la decoloración observada con la decoloración que se observa en la planta testigo o parte de la planta testigo para identificar las plantas o partes de plantas que no muestran decoloración o que muestran una decoloración que es reducida en comparación con la planta o parte de la planta testigo, en donde la planta o partes de la planta a cribar son un material vegetal joven, semillas o semillas germinadas.
- 45

El método de la presente invención puede ser usado para cualquier planta que puede ser sometida a decoloración, pero es particularmente útil para productos agrícolas, en particular verduras o frutas, o para flores. Entre otras cosas el método es adecuado para vegetales foliosos, tales como lechuga, achicoria o endibia, para tubérculos como la patata o la batata, para raíces tales como el apionabo, para brotes como endibia "witloof" o belga, o para champiñones. El método puede usarse además para frutas como la manzana, banana, aguacate, melocotón, pera, albaricoque, mango, berenjena y para flores o tallos de flores, tales como los tallos de gerbera, flores de crisantemo, fondos de alcachofa, etc.

El método de cribado de la presente invención está destinado a identificar plantas que tienen una reducida decoloración de superficie inducida por herida en una o más de sus partes o tejidos. Para el cribado es por tanto muy práctico usar la parte o tejido que es propensa a la decoloración. En la lechuga, esto puede ser la hoja o una parte de la misma, tal como una perforación de la hoja, en la banana pueden usarse adecuadamente rodajas de la fruta pelada y en las flores las rodajas del tallo son un vehículo de prueba muy práctico.

Sin embargo, se ha encontrado que la decoloración puede ensayarse también en tejidos que no han sido heridos. En los Ejemplos se muestra que también los tegumentos de las semillas intactas y las puntas de las raíces son capaces de inducir una reacción coloreada en presencia de un sustrato añadido de forma exógena que puede ser convertido en un pigmento coloreado sin ser heridos. La reducción o la ausencia de esta reacción coloreada puede usarse en el cribado en busca de plantas que tienen una decoloración reducida.

En una realización específica el método es útil en particular para seleccionar plantas pertenecientes a la familia de las *Asteraceae*, en particular plantas del género *Lactuca*, y más en particular a las especies *Lactuca sativa* o plantas pertenecientes al género *Cichorium* y en particular a las especies *Cichorium intybus* y *Cichorium endivia* que muestran ausencia o reducción de decoloración de superficie inducida por herida.

La población de plantas que es cribada con el método de la presente invención puede ser cualquier población de plantas, pero preferiblemente es una población de plantas variable que tiene muchos miembros diferentes para aumentar las oportunidades de encontrar una planta que muestre una decoloración inducida por herida reducida. Tal población variable puede hacerse por medio de un tratamiento mutagénico usando por ejemplo sustancias químicas y/o irradiación, y por ello en el presente texto se la denomina población de plantas mutantes. Son poblaciones alternativas las colecciones de germoplasma, que son colecciones de plantas que muestran variación natural. También puede usarse una población de plantas transgénicas.

El método de la presente invención se lleva a cabo adecuadamente con partes de plantas que tienen una superficie herida. Son muestras de ensayo muy útiles discos que han sido troquelados de una hoja, los llamados discos de hoja. Alternativamente, puede usarse el tejido del nervio central de vegetales foliosos veteados. Adecuadamente, se cortan discos de tales nervaduras. En los frutos pueden evaluarse las superficies de corte de frutas partidas por la mitad, o alternativamente rodajas o dados. Para las flores, las rodajas del tallo son una muestra de ensayo muy útil.

La incubación tiene lugar adecuadamente en un entorno acuoso. El método puede ser llevado a la práctica muy bien con discos de hojas que se incuban en o entre papel de filtro humedecido. La respuesta de decoloración es entonces muy visible alrededor de los bordes de la herida en el papel.

Alternativamente, el entorno acuoso comprende agua o una solución. En una realización específica que se ilustrará más adelante con mayor detalle la solución contiene un sustrato tal como L-3,4-dihidroxifenilalanina. Este compuesto se convierte en la producción del pigmento negro melanina, por medio de la enzima polifenol oxidasa. Los compuestos alternativos que se pueden utilizar para el cribado de plantas de lechuga a este respecto incluyen pero no se limitan a ellos, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, L-tirosina y catecol.

La invención puede llevarse a cabo además con la progenie de una planta progenitora que muestra la ausencia o la reducción de la decoloración de la hoja inducida por la herida, para demostrar que la progenie tiene todavía la misma ausencia o reducción de decoloración de la hoja inducida por herida que se encuentra en la planta progenitora.

La invención puede llevarse a cabo también sobre partes de las plantas. Las partes de las plantas como las cabezas o las hojas de lechuga o de endivia suelen ser las partes que tienen una superficie cortada que puede ser objeto de decoloración.

Otras partes son los frutos, brotes, raíces, semillas, tubérculos, flores, tallos, etc.

En otra realización más de la presente invención pueden usarse las semillas o las semillas germinadas como vehículo sobre el cual se lleva a cabo el método de cribado en presencia de un sustrato añadido de forma exógena. En el caso de las semillas germinadas, las puntas radiculares jóvenes están implicadas en la reacción de coloración.

La invención es muy interesante comercialmente para identificar plantas mutantes que pueden usarse en el mercado de las verduras procesadas. Como se expuso anteriormente, la decoloración del producto agrícola, en particular de frutas y verduras frescas, se considera no deseable ya que el producto decolorado es rechazado por el consumidor.

*Descripción detallada de la invención.*

5 Cuando la lechuga es recolectada y procesada por corte, se generan muchas superficies heridas en la hoja que dan lugar a una respuesta significativa de la planta o de partes de la planta, que se manifiesta por una decoloración marrón o rosa en o adyacente a la superficie herida. También se puede observar enrojecimiento (coloración rosácea) en sitios distantes de la superficie herida en el nervio central de la hoja, así como el extremo. A veces el enrojecimiento se puede observar también en etapas precisamente antes de la recolección, lo que se considera que es debido al estrés abiótico o exceso de madurez de la cosecha.

Otras plantas, en particular otras verduras, frutas y flores, pueden ser también propensas a la decoloración. El método de la presente invención es por tanto también un cribado muy conveniente para identificar otras plantas, en particular otras verduras, o frutas o flores que muestren una reducida respuesta de decoloración inducida por herida.

15 Las diferentes formas de decoloración son efectuadas por actividad enzimática, que está fuertemente potenciada como consecuencia de la herida y que genera diversas formas de polifenoles y productos de reacción derivados de los mismos.

Una importante actividad enzimática implicada en la reacción de pardeamiento es la PPO. La actividad de la PPO en relación con el pardeamiento enzimático no está restringida a la lechuga sino que ha sido descrito para otras muchas especies de plantas como implicada en el deterioro posterior a la recolección, como en la manzana, el plátano y la patata. De hecho la PPO es ampliamente reconocida como una de las enzimas más importantes implicadas en el deterioro posterior a la recolección de muchas frutas y verduras frescas procesadas.

20 Por esta razón la PPO ha sido el objetivo de muchas tecnologías que tienden a la reducción o la prevención de su actividad con el fin de aumentar la calidad post-recolección de productos alimenticios. La PPO cataliza una reacción en la que los polifenoles que residen en el tejido de la planta son oxidados para dar lugar a la formación de o-quinonas. Subsiguientemente, reacciones enzimáticas y no enzimáticas conducen a la formación de pigmentos marrones o negros.

En muchas especies vegetales la PPO está codificada por una pequeña familia de genes cuyos miembros individuales pueden tener diferentes patrones de expresión temporal y espacial indicativos de una divergencia funcional. Por ejemplo, se ha demostrado que la lechuga contiene distintas isoformas de PPO en el tejido fotosintético y vascular de la hoja.

El sustrato natural de la PPO puede diferir entre las distintas especies. La Tabla 1 expone los sustratos de la PPO para varias verduras y frutas que son objeto de decoloración al ser heridas. Estos y otros sustratos pueden ser usados en un método de cribado basado en sustrato exógeno de la presente invención.

Fuente	Sustratos fenólicos
Manzana	ácido clorogénico (pulpa), catecol, catequina (piel), ácido cafeico, glicósidos de flavonol, 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), ácido 3,4-dihidroxibenzoico, p-cresol, 4-metil catecol, leucocianidina, ácido p-cumárico
Albaricoque	ácido isoclorogénico, ácido cafeico, 4-metil catecol, ácido clorogénico, catequina, epicatequina, pirogalol, catecol, flavonoles, derivados de ácido p-cumárico
Aguacate	4-metil catecol, dopamina, pirogalol, catecol, ácido clorogénico, ácido cafeico, DOPA
Banana	3,4-dihidroxifeniletilamina (dopamina), leucodelfinidina, leucocianidina
Berenjena	ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cumárico, derivados de ácido cinámico
Lechuga	tirosina, ácido cafeico, derivados de ácido clorogénico
Mango	dopamina-HCl, 4-metil catecol, ácido cafeico, catecol, catequina, ácido clorogénico, tirosina, DOPA, p-cresol

Champiñones	trosina, catecol, DOPA, dopamina, adrenalina, noradrenalina
Melocotón	ácido clorogénico, pirogalol, 4-metil catecol, catecol, ácido cafeico, ácido gálico, catequina, dopamina
Pera	ácido clorogénico, catecol, catequina, ácido cafeico, DOPA, ácido 3,4-dihidroxi benzoico, p-cresol
Patata	ácido clorogénico, ácido cafeico, catecol, DOPA, p-cresol, ácido p-hidroxifenil propiónico, ácido p-hidroxifenil pirúvico, m-cresol
Batata	ácido clorogénico, ácido cafeico, cafeilamida

En muchas plantas, el nivel de la enzima PPO no se induce específicamente al herir los tejidos de la planta sino que reside inactivamente en el cloroplasto. Al tener lugar la herida se activa la PPO, lo que se manifiesta por el hecho de que el sustrato fenólico que reside en las vacuolas se pone en contacto con la PPO debido a la rotura del tejido.

- 5 En la lechuga, la producción de polifenoles, que son el sustrato de la PPO, se induce al tener lugar la herida. Por consiguiente, el potencial de pardeamiento del tejido de la lechuga no parece estar limitado por la cantidad de PPO en el tejido de la hoja, sino más bien por la velocidad de la biosíntesis de polifenol al tener lugar la herida.

10 En relación con esto, la situación puede diferir entre cosechas. Por ejemplo, en la manzana la cantidad de polifenoles es suficiente para generar una respuesta de pardeamiento de las frutas dentro de una hora después de la herida, mientras que en la lechuga la reacción de pardeamiento puede llevar algunos días debido al hecho de que en la lechuga el conjunto de polifenoles necesita en gran medida ser sintetizado de nuevo al tener lugar la herida.

15 La síntesis de polifenoles tiene lugar a través de una ruta bioquímica bien caracterizada llamada ruta del fenilpropanoide. La primera etapa de esta ruta está catalizada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, Hahlbrock, K. y Scheel, D. (1989) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40, 347-369). La PAL convierte el aminoácido fenilalanina sintetizado a través de la ruta del shikimato en ácido cinámico.

20 En la lechuga, la herida de las hojas conduce a una fuerte inducción de la expresión del gen PAL y la actividad de la PAL. La formación de polifenoles está correlacionada con esta actividad enzimática, lo que sugiere que la actividad de la PAL inducida por la herida de la lechuga es un factor importante responsable del pardeamiento (Campos, R. et al. (2004) Physiologica Plantarum 121, 429-438 y las referencias citadas en la misma). Sin embargo, actualmente no está claro qué otros factores determinan el resultado final de la reacción de decoloración inducida por herida. Por ejemplo, se ha sugerido que la actividad de las peroxidases (POD) es importante también en el establecimiento del nivel de decoloración final (Fukumoto, L. R. et al (2002) J. Agric Food Chem. 540, 4503-4511; Martin - Diana A. et al. (2005) Biosci. Biotechnol. Biochem. 69, 1677-1685).

25 Como la actividad de la enzima depende de la disponibilidad de peróxido de hidrógeno interno, puede ser limitada la contribución de POD a la decoloración.

30 Además es evidente que la formación de la herida es percibida de alguna forma por la planta y subsiguientemente se genera una señal a través de una cascada, que actualmente está poco definida para la lechuga. Parece obvio que estas actividades se orientarán principalmente hacia la cicatrización de la herida y la defensa contra los agentes patógenos. Por consiguiente, es probable que estén implicados muchos factores genéticos en el montaje de la respuesta de decoloración del tejido de lechuga herido y cada uno de estos son objetivos potenciales para la modificación genética para reducir o eliminar la decoloración inducida por herida.

La mayoría de estos factores genéticos son actualmente desconocidos y para aquellos de los que se sabe que están implicados no está claro hasta qué punto estos factores juegan un papel específico en la reacción de decoloración o quizás tienen una función más general en relación con la fisiología de la herida de la planta.

35 Por ejemplo, aunque se considera que la actividad de PAL inducida por herida es determinante del nivel de pardeamiento de la lechuga, se sabe que hay productos de la ruta del fenilpropanoide que están implicados, entre otras cosas, en la biosíntesis de la pared celular o también en la respuesta de defensa. Por consiguiente, la reducción de la actividad de PAL inducida por herida con el fin de reducir el potencial de pardeamiento puede comprometer otras funciones además del pardeamiento inducido por herida que pueden ser menos deseables en  
40 relación con otros aspectos del cultivo de la lechuga.

Del mismo modo, la actividad de PPO se ha atribuido como implicada en la respuesta de defensa y por consiguiente la reducción del potencial de pardeamiento reduciendo los niveles de PPO puede hacer que aumente la susceptibilidad a los agentes patógenos (Thipyapong, P. et al (2004) Planta 220, 105-117). Por consiguiente, los presentes inventores razonaron que un planteamiento sin prejuicios puede tener más éxito en este aspecto. Tal planteamiento comprende las etapas siguientes:

- 5 1. Generación de una población de plantas variante, en particular una población mutante. Tal población mutante puede ser generada por tratamiento de semillas o de tejidos de plantas con agentes mutagénicos tales como el metano sulfonato de etilo (ems) o los rayos X.
- 10 2. La puesta a punto de un cribado fenotípico eficiente en el que la selección se basa en una decoloración de la planta en particular una decoloración inducida por la respuesta a la herida de la planta, que se canaliza a través de PAL y/o PPO.
3. Caracterización de los mutantes modificados en su respuesta a la herida en relación con el potencial de decoloración posterior a la recolección y la ausencia de efectos pleiotrópicos de la modificación, que comprometen el crecimiento y procesamiento de la planta, de acuerdo con la práctica común.
- 15 La presente invención se refiere entonces a un método de cribado para identificar, seleccionar y obtener una planta que muestra una reducida decoloración inducida por herida y trastornos reducidos de procesamiento después de la recolección, tales como pardeamiento o enrojecimiento enzimático. En el método de cribado, la decoloración puede observarse en una superficie de la herida pero también se encontró que los tejidos intactos muestran también una reacción de coloración al añadir un sustrato.
- 20 Una población de plantas mutantes para su uso en el método de la presente invención puede ser preparada, por ejemplo, de la forma que sigue:
  - a) tratar semillas M0 de una especie vegetal que se ha de modificar con un agente mutagénico para obtener semillas M1;
  - b) cultivar plantas a partir de las semillas M1 así obtenidas para obtener plantas M1;
  - 25 c) opcionalmente repetir la etapa b) y la c) n veces para obtener semillas M1+n;
  - d) germinar las semillas M1+n así obtenidas y cultivar las plantas a partir de esas semillas.

De acuerdo con la invención, estas plantas se ensayan subsiguientemente en relación con su respuesta de decoloración inducida por herida. Las plantas que no muestran una respuesta de decoloración a la herida o que muestran una respuesta reducida son elegidas. Después, se cultiva la progenie de las plantas elegidas y se mide la respuesta de decoloración inducida por herida.

Con el fin de crear variabilidad genética puede hacerse uso de la mutagénesis. Los profesionales expertos en la técnica conocen diversos tratamientos químicos o físicos, que pueden usarse para inducir mutaciones genéticas en especies vegetales. Por ejemplo, se pueden tratar las semillas en una solución que contiene distintas concentraciones de un mutágeno como el ems. El ems alquila principalmente restos G de una cadena de DNA, lo que durante la replicación del DNA provoca el emparejamiento con T en vez de con C. Por consiguiente, los pares de bases GC cambian a pares de bases AT a una frecuencia que está determinada por la dosis efectiva de ems y la actividad del sistema de reparación de discordancias de la planta.

La dosis efectiva de ems depende de la concentración usada, el tamaño y otras propiedades físicas de la semilla, y el tiempo de incubación de las semillas en la solución de ems. Las semillas que han sido tratadas con un agente mutagénico se llaman típicamente semillas M1. Como consecuencia del tratamiento, los tejidos de las semillas M1 contienen mutaciones puntuales aleatorias en los genomas de sus células, y aquellas presentes en la subpoblación de células, que formarán el tejido de la línea germinal (células germinales) serán transferidas a la siguiente generación, que se denomina M2. Las mutaciones o combinaciones de las mismas que son haplo-insuficientes causando así esterilidad o que inducen letalidad embrionaria, no serán transferidas a la generación M2.

Un procedimiento similar al que se describió antes para el uso de ems es válido también para otros agentes mutagénicos. Agentes mutagénicos adecuados son bien conocidos en la técnica. Son particularmente útiles los agentes mutagénicos alquilantes, tales como sulfato de dietilo (des), etilenimina (ei), propano sulfato, N-metil-N-nitrosouretano (mnu), N-nitroso-N-metilurea (NMU), N-etil-N-nitrosourea (enu), azida sódica.

Alternativamente, las mutaciones son inducidas por medio de irradiación, que se elige por ejemplo entre rayos X, neutrones rápidos, radiación UV.

En otra realización de la presente invención, las mutaciones son inducidas por medio de ingeniería genética, por ejemplo por medio del uso de oligonucleótidos quiméricos, recombinación homóloga, direccionamiento génico, introducción de genes diana modificados que compiten con el producto endógeno, regulación a la baja mediante interferencia del RNA, etc.

5 La población M2 de un tratamiento mutagénico puede ser usada en procedimientos de cribado dirigidos a la respuesta a la herida, que se canaliza a través de PAL y PPO. Para un profesional experto en la técnica es obvio que cualquier población de plantas que lleve variación genética puede tomarse como material de partida para tal cribado fenotípico, tal como colecciones de germoplasma, que son colecciones de plantas que muestran variación natural o poblaciones de plantas transgénicas.

10 La producción de semillas M1 y M1+n se realiza adecuadamente por medio de la autopolinización.

Con el fin de llevar a cabo el cribado fenotípico de la invención, debe ser generada una superficie herida ya que la reacción enzimática de decoloración se induce por herida. Tal herida puede conseguirse mediante corte, punzamiento, recorte, abrasión, aplastamiento, rotura, pelado, trituración, prensado, rasgado, molienda, inyección de fluido, choque osmótico, separación, siega, lagrimeo.

15 Se encontró que el método de la presente invención en el que se usa un sustrato añadido de forma exógena, puede también llevarse a la práctica en tejidos y partes de plantas intactos, tales como las semillas, en situaciones en las que la PPO está al alcance del sustrato, por ejemplo cuando la PPO es segregada o localizada fuera de la célula. La enzima que induce la reacción coloreada es entonces también disponible sin herida previa.

20 Después de la herida o cuando no se necesita herir ha de manifestarse una característica fenotípica que es diagnóstico para la ruta que conduce a la decoloración del tejido y que puede ser usadas muy eficazmente en un cribado de la población mutante.

25 Sorprendentemente, se encontró que tales características fenotípicas pueden obtenerse tomando partes de la planta e incubándolas bajo condiciones muy específicas que favorecen que ocurran diferentes formas de decoloración, en particular la decoloración de la superficie por herida. Subsiguientemente, se pueden aplicar tales ensayos a gran número de plantas mutantes con el fin de seleccionar aquellas plantas que muestran una reducción de la respuesta de decoloración inducida por herida.

30 Una realización de esta invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que cuando se toman discos de hojas, tales como hojas de lechuga o de endivia, y se incuban entre papeles de filtro húmedos a 5 °C, después de aproximadamente 4 días se hace evidente la formación de un colorante rosa en los bordes de los discos de hojas. Un papel de filtro adecuado es el papel de filtro de tipo 1450 CV, n° de referencia 10 313 281 de Schleier & Schuell, Microscience GmbH, Dassel, Alemania. Al tener lugar una incubación adicional, la señal se intensifica y después de aproximadamente una semana se ha alcanzado la intensidad máxima. La formación del colorante rosa ocurre específicamente en las superficies heridas.

35 La decoloración se puede medir puntuando en una escala visual de 0, que significa la ausencia de pardeamiento o enrojecimiento, a 10, que significa pardeamiento y enrojecimiento igual que una variedad de lechuga estándar (*L. sativa*). En el presente ejemplo la variedad "Troubadour" de *L. sativa* se utiliza como patrón para el 10.

40 Si se desea, se pueden utilizar imágenes para comparación para puntuar las clases intermedias entre 0 y 10. Además, pueden hacerse imágenes digitales del papel de filtro con el colorante rosa, seguido por recuento por posición de disco de hoja del número de píxeles con un color rosa intenso. Utilizando una de estas medidas pueden llevarse a cabo análisis estadísticos simples tales como la prueba de la t, bien conocida por los expertos en la técnica, para establecer si una planta o un grupo de plantas es menos rosa o parda que el patrón. El nivel de significación aplicado de una prueba unilateral es 0,001.

45 Para los mutantes, se puede hacer una comparación estadística entre las puntuaciones de enrojecimiento de la variedad original, que es el mejor patrón disponible, y las puntuaciones de enrojecimiento de los mutantes individuales y/o de su descendencia.

50 Para encontrar el rasgo de la presente invención en plantas existentes pueden usarse muestras representativas de variedades, líneas de cultivo y/o entradas en bancos de genes. La comparación estadística puede hacerse entre las puntuaciones de enrojecimiento de la accesión individual bajo investigación y el resto de la población. Cuando se prueban estadísticamente individuos pueden necesitarse significativamente menos ensayos de comparación múltiple de enrojecimiento para mantener niveles de significación globales apropiados, por ejemplo la prueba de comparación múltiple de Dunnett con un patrón (Dunnett CW, J. AMER. Statist. Assoc. 50: 1096-1121 (1955)).

Además, se ha demostrado que esta respuesta se puede obtener usando muchos tipos diferentes de tejidos de hojas de diferentes etapas de desarrollo. Por ejemplo, en la lechuga el tejido del nervio central se puede inducir también para dar esta respuesta a la herida. Cuando se aplica a diferentes tipos de lechugas, tales como la "butterhead" o mantecosa, la iceberg, la lechuga cos o francesa, la batavia o la hoja de roble, no se encontraron accesiones individuales que mostrasen un enrojecimiento significativamente menor que el resto de la población investigada. Se concluye por tanto que dentro de los tipos de lechuga cultivados no hay variación genética, o tan solo muy limitada, para la decoloración rojiza inducida por herida.

Se demostró además de acuerdo con la invención que un inhibidor específico de la PPO, L-cisteína, cuando se aplica durante la reacción, suprimió de forma muy acusada la formación del colorante rosa. Además, se encontró que la formación del colorante rosa era inhibida por el cinamaldehído, que es un inhibidor de la actividad de PAL y el pardeamiento de la lechuga recién cortada (Fujita, N. et al (2006) Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 672-676). Estos hallazgos muestran que la respuesta de decoloración rosa de la lechuga es dependiente de PAL y PPO.

Se sabe que el pardeamiento enzimático de la lechuga recién cortada se evita muy eficazmente mediante la aplicación de un breve choque térmico. El efecto observado puede explicarse suponiendo un nuevo planteamiento de la ruta de la biosíntesis de proteínas desde la ruta del fenilpropanoide hacia proteínas de choque térmico reduciendo así el flujo metabólico hacia la formación de polifenoles.

Alternativamente, el efecto puede explicarse suponiendo que las enzimas implicadas en la oxidación del polifenol, tales como PPO y POD, son inactivadas por el tratamiento de choque térmico. Cuando se aplica el choque térmico a la lechuga que se ensaya subsiguientemente en cuanto a la respuesta de enrojecimiento, se ha demostrado que esta respuesta, como el pardeamiento enzimático, era inhibida eficazmente. Esto demuestra que la respuesta de enrojecimiento de la lechuga, que es parte de esta invención, es fisiológicamente muy similar a la bien conocida respuesta de pardeamiento enzimático.

Este hallazgo fue mejor sustanciado mediante la aplicación de L-cisteína como agente reductor. Se sabe que la L-cisteína, además de ser un inhibidor de la PPO, reacciona también con o-quinonas coloreadas y las convierte de nuevo en difenoles incoloros en una reacción de reducción química. Cuando el colorante rosa formado por los discos de hoja de lechuga se trata con L-cisteína, se demostró que el compuesto rosa se convertía en un compuesto incoloro. Por tanto, parece probable que el colorante de color rosa es una o-quinona formada por PPO.

Esto fue corroborado por el hallazgo de que agentes reductores tales como el ácido ascórbico o el glutatión convierten también el colorante rosa en un compuesto incoloro.

Además, cuando las plantas que se recogen del campo y que muestran enrojecimiento, son tratadas con L-cisteína, también se elimina la decoloración rosa. Esto demuestra que la respuesta de enrojecimiento del disco de hoja está representando el fenómeno de enrojecimiento que tiene lugar de forma natural, que a veces puede verse en las plantas que crecen bajo condiciones de campo.

Otra realización de esta invención se basa en el siguiente experimento. Se producen partes de una hoja de lechuga de una cabeza cortándolas y se incuban a 16 °C en aire. Como respuesta la superficie herida se pone marrón después de aproximadamente 4 días. Especialmente en la superficie herida de la vena principal puede observarse el pardeamiento con claridad. Además, la reacción de pardeamiento puede también ser observada a nivel de planta completa al dañar las hojas mediante corte o abrasión.

Todas estas reacciones de pardeamiento pueden ser inhibidas completamente por L-cisteína, un inhibidor de PPO, lo que demuestra que estos fenotipos se manifiestan a través de la actividad de PPO y por consiguiente se pueden considerar diagnóstico para el pardeamiento posterior a la recolección como se observa durante el procesamiento y envasado de la lechuga.

Estas reacciones de pardeamiento inducidas por herida se pueden generar de una manera eficiente que puede ser aprovechada en un procedimiento de cribado fenotípico para identificar plantas mutantes que tienen un potencial reducido de pardeamiento inducido por herida.

Otra realización de esta invención se basa en la decoloración en superficies heridas de tejidos de lechuga, o la reacción coloreada observada en, sobre o cerca de los tejidos intactos de lechuga, tales como revestimientos de semilla de lechuga, inducida aplicando sustratos que pueden ser convertidos en compuestos coloreados por las enzimas oxidantes del fenol.

Por ejemplo, cuando los discos de hojas de lechuga se incuban con el sustrato de la PPO L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), se observa una decoloración de marrón oscuro a negro en la superficie herida que es la manifestación de la formación de melanina a través de la PPO. Cuando se aplicó simultáneamente L-cisteína, la decoloración negra se inhibió completamente lo que confirma la suposición de que esta decoloración está mediada por la PPO.

Aunque no se considera que la L-DOPA sea un sustrato natural para la PPO de la lechuga, puede ser útil en ensayos dirigidos a la identificación de mutantes que muestran una reducida decoloración inducida por herida.

De manera similar a la descrita para la L-DOPA se pueden aplicar otros sustratos para producir una respuesta de decoloración. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, L-tirosina, y catecol.

5 Tomados en conjunto, la formación de los diversos colorantes en superficies heridas generadas en plantas monitoriza modificaciones en una ruta que empieza por la inducción de una señal de herida, canalizada a través de PAL y PPO y que lleva a la decoloración. Como se ha descrito, estas reacciones de decoloración inducida por herida pueden ser fácilmente evaluadas por inspección visual lo que permite un procedimiento de cribado de mutantes muy eficiente. La base subyacente al método descrito por esta invención se ilustra en la Figura 1.

10 De acuerdo con esta invención, se ha encontrado por tanto que la ruta de decoloración inducida por herida de discos de hoja *in vitro* se solapa en gran medida con la decoloración inducida por herida de la lechuga procesada a escala industrial y por lo tanto se puede considerar diagnóstico para este proceso. Esto está confirmado por la noción de que los inhibidores de PAL o PPO inhiben el pardeamiento enzimático de la lechuga procesada y envasada bajo condiciones industriales prácticas. Es importante el hecho de que como el procedimiento comprende la etapa de inducción, esto es de herida, y una de las conversiones metabólicas finales mediadas por la PPO, el procedimiento permite capturar todos los factores genéticos directa o indirectamente involucrados en este proceso fisiológico. Además, como esta respuesta puede ser generada usando una gama completa de tejidos de hoja o de hojas en diferentes etapas de desarrollo, los cribados de mutantes pueden ser apuntados hacia estas diferentes etapas o tejidos cuando se considere relevante.

20 Las plantas mutantes, que han sido identificadas como que están modificadas con respecto al proceso fisiológico que conduce desde la herida a una decoloración dependiente de PAL y de PPO basada en uno o más de los ensayos fenotípicos descritos anteriormente, pueden ser caracterizadas adicionalmente. Tal caracterización se puede hacer en diferentes niveles, por ejemplo a nivel molecular, bioquímico, fisiológico y fenotípico.

25 Es obvio para los profesionales expertos en la técnica que se pueden observar niveles de decoloración variables que pueden reflejar bien sea la presencia de diferentes loci mutantes o diferentes formas alélicas de loci idénticos que afectan al rasgo de decoloración en la población original.

30 En el caso de mutaciones recesivas estas dos posibilidades se pueden distinguir fácilmente llevando a cabo pruebas de alelismo, que comprenden cruzar las dos plantas mutantes y determinar el fenotipo del híbrido. En caso de alelismo de las mutaciones, el rasgo de decoloración reducida será evidente en la F1, mientras que en caso de que el fenotipo de los mutantes se determine por diferentes loci recesivos, esto no será el caso.

35 Como en una realización de la presente invención se aplica mutagénesis aleatoria para generar la población de partida, las mutaciones en la base genética pueden contribuir también a la variación del fenotipo bajo las condiciones experimentales. Con el fin de discriminar entre mutaciones individuales de diferentes intensidades y un efecto combinado de las mutaciones en la base genética, se deben realizar retrocruzamientos para crear fondos genéticos uniformes para los diferentes eventos de decoloración reducida.

Tal procedimiento es además relevante con el fin de determinar si las mutaciones en loci específicos implicados en la decoloración inducida por herida muestran efectos pleiotrópicos.

40 Las plantas M2 así seleccionadas sobre la base de una respuesta de decoloración reducida se usan para cultivar semillas M3. Subsiguientemente, las líneas creadas que descienden de los eventos de decoloración reducida son reevaluadas en relación con su respuesta a la herida reducida. Además, puede evaluarse el pardeamiento o enrojecimiento reducido en diferentes fondos genéticos y bajo diferentes condiciones de cultivo y procesamiento. Los métodos de cribado de la presente invención pueden ser usados para todas estas evaluaciones.

45 Se pueden realizar estudios bioquímicos para tratar cuestiones relacionadas con las rutas afectadas por la modificación genética. Se pueden realizar estudios moleculares para determinar si se han modificado los genes candidatos supuestamente implicados en la respuesta de oxidación enzimática o de enrojecimiento como los genes que codifican PAL, PPO o peroxidasas. Posteriormente se llevará a cabo análisis genético para demostrar si la modificación encontrada en un gen candidato es causal con respecto al fenotipo alterado.

50 Aunque la mutagénesis inducida es el método preferido de proporcionar una población de plantas a usar en este método de cribado, las personas expertas en la técnica saben que existe una tecnología que permite modificar dianas de genes que residen en el genoma de una planta de una manera específica. Por ejemplo, se ha demostrado que los oligonucleótidos quiméricos son mutágenos eficaces con un modo de acción específico.

- Otro planteamiento es modificar dianas génicas mediante la recombinación homóloga o el direccionamiento de genes. Usando este planteamiento, un fragmento de un gen es intercambiado por un fragmento de DNA introducido que contiene una modificación deseada. También son factibles enfoques transgénicos en los que se introducen genes diana modificados que compiten con el producto endógeno. Esto puede conducir a efectos negativos dominantes. Además la regulación por defecto específica de la expresión de genes es factible a través de la interferencia de RNA.
- 5
- En el caso de que se utilicen oligonucleótidos mutagénicos, direccionamiento génico o planteamientos transgénicos para modificar un factor genético implicado en la respuesta de decoloración inducida por herida, obviamente, debe ser conocida la estructura primaria de los genes relevantes.
- 10
- Cuando plantas de la progenie de mutantes particulares cultivados a partir de semillas obtenidas por autofertilización se ensayan en relación con el enrojecimiento, se observa una reducción similar a la que se ha encontrado para el mutante identificado originalmente. Esto demuestra que una respuesta de decoloración rosa reducida puede ser heredable y causada por una modificación del genoma.
- 15
- Otro sorprendente hallazgo fue el hecho de que cuando las plantas de la progenie de mutantes identificados como que muestran una decoloración inducida por herida reducida se cultivan hasta la madurez y se ensayan en relación con el pardeamiento enzimático del tejido herido de la nervadura central, esta respuesta está también fuertemente inhibida. Esto demuestra que el ensayo de enrojecimiento de discos de hoja está relacionado causalmente con el pardeamiento enzimático en la lechuga y que el ensayo de enrojecimiento se puede utilizar para predecir el nivel de pardeamiento enzimático de una planta de lechuga madura.
- 20
- Por lo tanto, el ensayo de enrojecimiento de disco de hoja se puede utilizar como una herramienta de selección para identificar las plantas de lechuga con un potencial de pardeamiento enzimático reducido. Dicha herramienta puede ser utilizada para identificar las plantas de lechuga con un reducido potencial de pardeamiento enzimático a partir de cualquier tipo de población de plantas al margen de la causa de la variación genética, que reside en tal población. Por ejemplo, además de las poblaciones de EMS, se pueden usar accesiones naturales o poblaciones de cría.
- 25
- El método de cribado puede ser también usado para cribar otras plantas que muestran decoloración inducida por herida.
- Uno o más de los métodos de cribado proporcionados por la presente invención se pueden aplicar por ejemplo a cualquier especie vegetal para la que se necesite mejorar la calidad del tratamiento posterior a la recolección. Además de a la lechuga cultivada esta invención puede aplicarse también a otras especies de plantas, por ejemplo pertenecientes a las *Asteraceae*, tales como especies silvestres del género *Lactuca*, o especies de plantas pertenecientes al género *Cichorium* al que pertenecen las especies como las endivias (*Cichorium endivia*) achicoria y endivia witloof (*Cichorium intybus*). Además, otros vegetales de cosecha tales como manzana, achicoria, patata, batata, apionabo, champiñón, banana, aguacate, melocotón, pera, albaricoque, mango, berenjena, y para flores o tallos de flores, tales como flores de gerbera, flores de crisantemo, fondos de alcachofas, etc., pueden ser cribados con los métodos de la presente invención.
- 30
- 35
- La presente invención se refiere a un método para detectar una característica fenotípica en una planta llevando a cabo uno de los métodos de cribado que se describen en el presente texto. La presencia de la característica se determina por medio de una o más de tres pruebas de decoloración, que son la aparición de enrojecimiento o pardeamiento o la capacidad para convertir un sustrato en un pigmento coloreado, tal como L-DOPA en melanina.
- 40
- El "testigo", como se usa en el presente texto, es cualquier planta de la que se sabe que muestra una o más reacciones de decoloración de enrojecimiento, pardeamiento y conversión de L-DOPA en melanina, las cuales reacciones pueden ser inhibidas por L-cisteína o cinamaldehído. Adecuadamente se utiliza una planta de la que un disco de hoja u otra parte de la planta, cuando se incuba entre papel de filtro humedecido a 5 °C durante 7 días, muestra decoloración rosa alrededor de los bordes del disco o parte.
- 45
- La presente invención se ilustrará con más detalle en los Ejemplos que siguen y que no se pretende que limiten la invención en modo alguno. Los Ejemplos hacen referencia a discos de hoja y semillas de lechuga, *Cichorium* y berenjena, pero en vez de lechuga pueden usarse otras plantas o partes de las mismas, en particular frutas y verduras frescas. En los Ejemplos se hace referencia a las figuras siguientes.
- 50
- Figura 1: Descripción esquemática de las razones tras del diseño del procedimiento de cribado de mutantes de poblaciones de lechuga para la reducción de la decoloración enzimática posterior a la recolección. La señal de entrada del cribado es la formación de una herida del tejido de la hoja, que es detectada por la planta y que genera una respuesta de señalización divergente que conduce a cierto número de procesos fisiológicos incluyendo senectud, respiración y decoloración del tejido. Esta señal de entrada puede combinarse con la aplicación de compuestos fenólicos como sustratos de PPO.

La señal de salida del cribado es una decoloración marrón o rosa, que depende de las condiciones aplicadas, del diagnóstico de la superficie herida para pardeamiento y enrojecimiento posterior a la recolección. Esto se infiere del hecho de que la señal de salida se inhibe completamente por el cinamaldehído y la L-cisteína, que son inhibidores específicos de PAL y PPO, respectivamente.

5 Figura 2: Imagen representativa del fenotipo de salida del cribado basada en la decoloración rosa de discos de hoja. Discos de hoja de plantas de lechuga (1 disco por planta) se disponen entre papeles de filtro húmedos y se incuban a 5 °C durante 7 días. Puede ser claramente observada una decoloración color rosa alrededor de cada disco de hoja en la superficie herida.

10 Figura 3: El ensayo de enrojecimiento del disco de hoja (4 discos por plato) llevado a cabo en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de PAL cinamaldehído. El número encima de cada plato muestra el % de cinamaldehído usado.

Figura 4: Efecto inhibitor del inhibidor de PPO L-cisteína sobre la decoloración rosa de discos de hoja de lechuga (4 discos por plato) incubados entre papeles de filtro humedecidos. El número encima de cada plato muestra el % de L-cisteína utilizado.

15 Figura 5: Efecto inhibitor del inhibidor de PPO L-cisteína sobre la decoloración negra de discos de hoja de lechuga (4 discos por plato) incubados entre papeles de filtro humedecidos en presencia de L-DOPA 1,5 mM. El número encima de cada plato indica la concentración mM de L-cisteína utilizada.

Figura 6: El efecto del pretratamiento por choque térmico sobre el enrojecimiento de discos de hoja de lechuga. El choque térmico se aplicó durante 90 segundos sobre hojas intactas a la temperatura indicada en cada plato.

20 Figura 7: Conversión del colorante rosa formado por la respuesta de la lechuga a la herida en un compuesto incoloro por L-cisteína. La fila superior de platos muestra el ensayo de L-DOPA, mientras que la fila inferior de platos muestra el ensayo de enrojecimiento. El inferior de los dos discos en cada plato fue tratado con L-cisteína después haberse completado la respuesta a la herida. Los valores de la concentración de L-cisteína usados son 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 mM, que se indica anteriormente.

25 Figura 8: Reducción del enrojecimiento en lechuga cultivada por L-cisteína. El panel superior muestra los síntomas típicos de enrojecimiento de una hoja de lechuga tomada de una planta, que se sometió a estrés extremo por anegamiento. Las venas principales muestran la presencia de un colorante rosa. El panel inferior derecho muestra un disco tomado de la hoja que muestra síntomas de enrojecimiento después del tratamiento con L-cisteína 1 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. El panel inferior izquierdo muestra un disco de hoja similar después del  
30 tratamiento con agua durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Figura 9: Panel A: Análisis fenotípico de plantas individuales de lechuga M2 (agrupadas en grupos) en relación con la decoloración de discos de hoja de acuerdo con el método descrito por esta invención. En este panel se muestra un total de 138 muestras de entre 12000 de las cuales la indicada por una flecha mostró una decoloración de enrojecimiento fuertemente reducida. Panel B: El reensayo del individuo seleccionado indicado en el panel A confirmó la casi total ausencia de formación de la decoloración rosa (muestra en la posición del medio) en  
35 comparación con muestras testigo que muestran una clara respuesta de decoloración.

Figura 10: Fenotipos de plantas de lechuga M2. Las plantas marcadas 1, 2, 4, 5, 7, 10 y 12 muestran una reducida decoloración rosa del disco de hoja usando el ensayo de acuerdo con esta invención. Las plantas 3, 6, 8, 9 y 11 son plantas que mostraron un nivel de decoloración rosa del disco de hoja comparable con el testigo de tipo silvestre. La planta 1 es el único ejemplo de un mutante que muestra una intensa reducción de la decoloración rosa y un hábito de crecimiento normal. Las plantas 2, 4, 5, 7, 10 y 12 muestran decoloración rosa reducida y un fenotipo enano  
40 blanqueado.

Figura 11: Ensayo de la progenie de un mutante de lechuga que muestra una decoloración reducida. A la izquierda se exponen 25 muestras testigo que muestran una respuesta normal de decoloración inducida por herida. A la  
45 derecha, se expone un grupo de muestras que se toma de una serie de 35 plantas de progenie derivadas de un mutante único, que se reduce en gran medida en su respuesta de decoloración inducida por herida.

Figura 12: Imagen representativa del fenotipo de salida del cribado basado en la decoloración parda de las partes de nervadura central de hojas tomadas de plantas de lechuga maduras. La imagen muestra discos de tejido de nervadura central de la hoja externa de lechuga después de la incubación durante 3 días a 16 °C. La decoloración  
50 parda típica puede ser observada claramente en la superficie de la herida. Cada plato contiene 3 discos tomados de diferentes posiciones de la nervadura central (verde, verde claro y blanco). El número sobre el plato indica la concentración mM de L-cisteína, que fue añadida al filtro.

Figura 13: Conversión de L-DOPA en la superficie de la hoja de lechuga en melanina. El panel A muestra el ensayo en una solución 1,5 mM de L-DOPA. El tubo superior es el testigo negativo, los otros 3 tubos son idénticos. El panel B muestra el resultado de la incubación de discos de hoja entre papeles de filtro húmedos, que contienen L-DOPA 1,5 mM.

5 Figura 14: Ensayo de la progenie de un mutante de lechuga que muestra una reducida decoloración rosa inducida por herida en el pardeamiento de la nervadura central. El panel A muestra los discos de nervadura central de 8 plantas de la progenie, numeradas del 1 al 8 (3 discos por planta) del mutante de pardeamiento reducido. El panel B muestra los discos de nervadura central de 8 plantas testigo numeradas de 9 a 16 (3 discos por planta), que muestran una respuesta normal de pardeamiento.

10 Figura 15: Evaluación de un mutante de lechuga que muestra una reducida decoloración de enrojecimiento inducida por herida o respuesta de pardeamiento después del corte y envasado bajo la atmósfera ambiente. Los trozos de hoja de la cabeza de una planta testigo se muestran a la izquierda y los trozos de hoja del mutante de decoloración reducida se muestran a la derecha. El material de hoja recién cortada se almacenó durante 6 días a 4 °C. La decoloración parda se puede observar claramente en las muestras testigo mientras que las muestras de mutante permanecen sin cambios.

Figura 16: Ensayo de enrojecimiento en *Cichorium endivia* (panel izquierdo) y *Cichorium intybus* (panel derecho).

Figura 17: Ensayo de ácido clorogénico en discos de hoja de lechuga.

Figura 18: Respuesta de pardeamiento en berenjena cortada.

Figura 19: Ensayo de L-DOPA en semillas de lechuga (fila de arriba) y berenjena (fila de abajo).

20 Figura 20: Ensayo de L-DOPA en semillas de lechuga germinadas.

Figura 21: Ensayo de catecol en semillas de lechuga germinadas.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

*Modificación genética de la lechuga usando ems.*

25 Aproximadamente 2000 semillas de las variedades de lechuga Troubadour, Apache, Yorvik y Roderick se incubaron en una solución aireada de 0,05% (p/v) o bien de 0,07% (p/v) de ems durante 24 horas a temperatura ambiente. Después del tratamiento con ems las semillas M1 fueron enjuagadas con agua y plantadas en un invernadero a 20 °C con un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad para desarrollar las plantas maduras e inducir la fructificación prematura y la floración con el fin de producir semillas M2. Después de la maduración, las semillas

30 M2se recolectaron, se agruparon y se almacenaron para usarlas más adelante. La frecuencia de mutación se estimó sobre la base del número relativo de las plantas individuales con un fenotipo blanqueado que son alteradas en la biosíntesis de clorofila.

### EJEMPLO 2

35 *Desarrollo de un diagnóstico de cribado fenotípico para la decoloración de lechuga inducida por herida basado en la formación de pigmento rosa.*

Se desarrolló un ensayo fenotípico en el que la decoloración de la hojas de lechuga inducida por herida puede ser fácilmente evaluada. Este planteamiento permite el cribado de plantas jóvenes en relación con la decoloración. Se tomaron discos de hoja de 5 mm de diámetro de plantas jóvenes o maduras y se pusieron entre papeles de filtro humedecidos en una bandeja. El sistema se incubó a 5 °C durante 7 días. Durante la incubación se desarrolló un

40 colorante rosa en el sitio herido del disco de hoja que se hizo claramente visible en forma de un círculo impreso sobre el papel de filtro (Figura 2).

Con el fin de demostrar que la producción de colorante rosa requiere una ruta de fenilpropanoide activo, en este ensayo fueron evaluados los efectos de los inhibidores de la PAL (cinamaldehído, Figura 3) y la PPO (L-cisteína, Figura 4). Cuando se aplicó cinamaldehído durante el ensayo, la decoloración rosa fue inhibida completamente a

45 una concentración de 0,01% o superior.

Un resultado similar fue obtenido utilizando L-cisteína a una concentración de 0,001% y superior, mientras que otros aminoácidos tales como la L-leucina o la L-alanina no mostraron efecto alguno. Esto demuestra que la L-cisteína puede inhibir la respuesta de enrojecimiento de los discos de hoja de lechuga y que el efecto inhibitorio de la L-cisteína es específico.

5 Con el fin de demostrar que la L-cisteína está actuando realmente como inhibidor de la actividad de la PPO en este sistema, los discos de hoja de lechuga se incubaron con el sustrato de PPO L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Aunque no se considera que la L-DOPA sea un sustrato natural para la PPO de la lechuga, se observó una decoloración de color marrón oscuro a negro en la superficie de la herida que es la manifestación de la formación de melanina a través de la PPO. Cuando se aplicaron simultáneamente una concentración 1 mM o superior de L-cisteína, la decoloración se inhibió completamente como se muestra en la Figura 5.

15 La respuesta de enrojecimiento del disco de hoja de lechuga se caracterizó más aplicando un choque térmico antes de inducir la respuesta a la herida. Las hojas desprendidas fueron incubadas durante 90 segundos a 21, 40, 50 y 60 °C. Después de este tratamiento se tomaron discos de hoja y se analizaron en relación con el enrojecimiento. La respuesta de enrojecimiento se inhibió completamente cuando se lleva a cabo el choque térmico a una temperatura de 50 °C o superior. Este resultado se muestra en la Figura 6.

Como se sabe que la L-cisteína reacciona con o-quinonas, que son productos de la PPO, convirtiéndolas de nuevo en difenoles incoloros, se determinaron los efectos de la L-cisteína sobre el colorante rosa que procede de discos de hoja de lechuga. En paralelo se determinó el efecto de la L-cisteína sobre la formación de melanina al tener lugar la incubación con L-DOPA.

20 Se tomaron discos de hoja y se incubaron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. Después de completarse la respuesta a la herida, se añadió una serie de concentraciones de L-cisteína al disco de hoja y se registró el cambio de color. El resultado se muestra en la Figura 7. El experimento demostró claramente que la L-cisteína estaba convirtiendo el colorante rosa de nuevo en un compuesto incoloro mientras que la melanina negra formada en el ensayo de L-DOPA no fue afectada por la L-cisteína. Esto demostró que el colorante rosa es muy probable una o-quinona que se forma por el sistema de oxidación del polifenol de la lechuga.

30 Para demostrar que la respuesta *in vitro* observada refleja una respuesta que es fisiológicamente relevante la decoloración basada en L-cisteína se aplicó a material vegetal cultivado en campo. Esto se llevó a cabo recolectando una hoja de una planta de lechuga cultivada en el campo que mostraba síntomas acusados de enrojecimiento lo largo de las venas. Esto se observa típicamente cuando las plantas han sido sometidas a estrés, por ejemplo por las condiciones de anegamiento severo. La hoja se utilizó para preparar discos de hoja que se incubaron inmediatamente mediante L-cisteína 1 mM. Después de aproximadamente 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la decoloración rosa desapareció tal como se muestra en la Figura 8.

35 En su conjunto, estos datos experimentales indican que los discos de hoja de lechuga pueden ser inducidos por herida para que produzcan decoloración rosa que es dependiente de PAL y PPO. Este fenotipo permite un procedimiento de cribado eficaz y efectivo para los mutantes de lechuga que tienen una respuesta modificada de decoloración inducida por herida canalizados a través de PAL, de PPO o de ambos.

### EJEMPLO 3

#### *Cribado de mutantes con un reducida decoloración inducida por herida.*

40 Con el fin de identificar mutantes de lechuga con bajo potencial de pardeamiento o enrojecimiento enzimático inducido por herida, se aplicó el ensayo de disco de hoja que se describe en el Ejemplo 2 a plantas de una población mutante de lechugas.

45 Se cultivaron 12.000 plantas en un invernadero (Localización: De Lier, Holanda, siembra el 28 de marzo; plantado 18 de abril; cultivo en las condiciones habituales de los cultivadores de lechuga) y de cada planta individual se tomó un disco de hoja (muestreo desde el 15 de mayo en adelante) y se incubó como grupos de 25 muestras (como promedio) entre papeles de filtro humedecidos a 5 °C durante 7 días. Se dio una puntuación visual a cada disco de hoja dependiendo de la intensidad de la decoloración rosa. Basándose en esta evaluación, las plantas se seleccionaron según que los discos de hojas mostrasen o no un grado relativamente bajo de decoloración de la superficie herida. La planta con trazas de decoloración apenas visibles fue numerada 06D.210202.

50 De las 12000 plantas, se seleccionó finalmente una planta que mostró solamente trazas de decoloración que apenas eran visibles y 11 que mostraron un nivel de decoloración relativamente bajo. El resultado de uno de estos ensayos se muestra en la Figura 9.

El ensayo de decoloración se repitió para los 12 individuos seleccionados inicialmente y para la mayor parte de los casos individuales se confirmó el resultado original. Sólo los individuos confirmados fueron seleccionados para posteriores análisis y producción de semillas.

#### EJEMPLO 4

##### 5 *Cribado de mutantes con una reducida decoloración inducida por herida.*

Con el fin de identificar mutantes de lechuga con bajo potencial de pardeamiento enzimático inducido por herida, se aplicó el ensayo de disco de hoja que se describe en el Ejemplo 2 a plantas de una población mutante de lechugas. Se cultivaron 8500 plantas en un invernadero hasta una edad de 3 semanas (6-8 etapa de foliación) y de cada planta individual se tomó un disco de hoja y se incubó entre papeles de filtro humedecidos a 5 °C durante 7 días.

10 Se dio una puntuación visual a cada disco de hoja dependiendo de la intensidad de la decoloración rosa. Basándose en esta evaluación, las plantas se seleccionaron según que los discos de hojas mostrasen o no un grado relativamente bajo de decoloración de superficie por herida. De las 8.500 plantas se seleccionaron 8 plantas que no mostraban decoloración visible y 10 mostraban una decoloración relativamente baja. El ensayo de decoloración se repitió para los 18 individuos que fueron seleccionados inicialmente y para la mayoría de los casos individuales se confirmó el resultado original. Doce individuos se muestran en la Figura 10. Sólo los individuos confirmados fueron seleccionados para su posterior análisis y producción de semillas. Una planta mutante sin efectos pleiotrópicos secundarios (por ejemplo, blanqueo, enanismo) recibió el número 05D.202539. La semilla producida por autofecundación de esta planta se numeró 05D.810596. La semilla producida por la autofecundación de tres plantas crecidas a partir de semillas de 05D.810596 fue numerada 07G.9979 y depositada en el NCIMB. El número de NCIMB es 41441 (depositado el 10 de octubre de 2006).

#### EJEMPLO 5

##### *Análisis fenotípico de los mutantes seleccionados que muestran reducida decoloración inducida por herida.*

De los 12 mutantes seleccionados del cribado presentado en el Ejemplo 3, seis de ellos mostraron un fuerte fenotipo de crecimiento reducido y de blanqueo. Otros mutantes se desarrollaron normalmente, esto es, de acuerdo con el tipo de la población de partida del experimento de mutagénesis.

Los mutantes enanos y blanqueados son probablemente perturbados en la función del cloroplasto. Como la PPO reside en estos orgánulos celulares, esto puede explicar la respuesta relativamente baja en los ensayos de disco de hoja. Como tales mutaciones pleiotrópicas son indeseables, se consideró que estos mutantes son menos relevantes.

30 La planta mutante 06D.210202 que mostró la reducción más intensa de la decoloración del disco de hoja mostró un fenotipo normal y la mutación se considera por tanto específica para la decoloración sin efectos pleiotrópicos intensos.

#### EJEMPLO 6

##### *Confirmación de la casi ausencia de fenotipo de decoloración en la descendencia.*

35 Para demostrar que la decoloración reducida de los mutantes de lechuga como la planta 06D.210202 de los Ejemplos 3 y 5 es causada por un efecto genético generado por el tratamiento de mutagénesis descrito en el presente texto, se produjeron semillas por autofertilización. La semilla producida por autofertilización de la planta 06D.210202 fue numerada 06D.819784. Las semillas se germinaron en tierra y las plantas se ensayaron en relación con la decoloración utilizando el ensayo de pardeamiento de discos de hoja.

40 Este experimento indicó claramente que el fenotipo alterado tenía una base genética ya que todas las plantas de la progenie mostraron un fenotipo similar, esto es, una fuerte reducción de la decoloración de enrojecimiento, igual que el mutante que se usó para producir las semillas. Este resultado se ilustra en la Figura 11.

La semilla producida por la autofecundación de tres plantas cultivadas a partir de semillas de 06D.819784 fue numerada 06D.863B2 y depositada en la colección NCIMB. El número de NCIMB es 41454 (depositado el 3 de enero de 2007).

#### 45 EJEMPLO 7

##### *Desarrollo de un diagnóstico de cribado fenotípico para la decoloración de la lechuga inducida por herida basado en la formación de pigmento marrón.*

Se cultivaron plantas de lechuga hasta la madurez y se tomaron partes de las hojas exteriores mediante el corte de discos del tejido de los nervios.

5 Los discos se incubaron sobre papel de filtro humedecido a 16 °C. Después de aproximadamente 72 horas, la superficie herida se había puesto marrón. En presencia de L-cisteína 10 mM la respuesta de pardeamiento se inhibió indicando que la decoloración observada está mediada por PPO. Un resultado representativo de tal experimento se muestra en la Figura 12.

10 Como la respuesta que se muestra en la Figura 12 es una respuesta de pardeamiento mediada por PPO, puede considerarse que el procedimiento de cribado como se describe en este ejemplo es efectivo e imparcial con el fin de cribar en relación con los mutantes que muestran decoloración parda reducida que ocurre durante el procesamiento de la lechuga.

#### EJEMPLO 8

*Desarrollo de un diagnóstico de cribado fenotípico para la decoloración de la lechuga inducida por herida basado en la conversión de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) en un pigmento negro llamado melanina.*

15 Además de los ensayos que se dirigen a la decoloración inducida por herida en un sentido amplio, el método de acuerdo con esta invención también permite realizar un cribado de una manera más específica en relación con los mutantes que tienen una actividad de PPO reducida. Un ensayo fenotípico que es indicativo de la actividad de PPO fue desarrollado mediante el uso de discos de hojas que se incubaron en presencia de L-DOPA 1,5 mM. Dado que se puso de evidencia una decoloración negra, se puede llegar a la conclusión de que la L-DOPA puede convertirse fácilmente por el sistema de oxidación de polifenol en la superficie de la herida de las hojas de lechuga en un pigmento negro llamado melanina. La L-DOPA se convierte por la PPO en la L-DOPA-quinona reactiva que se convierte no enzimáticamente a través de dopacromo e indol quinona en la melanina negra.

20 Además, se demostró que la reacción puede ser inhibida añadiendo L-cisteína 1 mM durante la reacción (Figura 5). Por consiguiente, este ensayo hace posible la identificación de mutantes que están modificados en la capacidad de montar una actividad de PPO en una superficie herida de una hoja. La respuesta de los discos de hoja de lechuga a la presencia de L-DOPA se puede observar tanto en solución como entre papeles de filtro humedecidos como se indica en la Figura 13.

#### EJEMPLO 9

*Evaluación de la descendencia de un mutante que muestra una ausencia casi total de decoloración en relación con la respuesta de pardeamiento reducida usando el ensayo de pardeamiento en discos de nervadura.*

30 Para demostrar que la reducción de la decoloración de los mutantes de lechuga como la planta número 06D.210202 de los Ejemplos 3, 5 y 6, que se reduce significativamente en la decoloración rosa de superficies heridas de discos de hoja, también se reduce eficazmente en la respuesta de pardeamiento inducida por herida, se cultivaron varias plantas de la progenie hasta la madurez.

35 En esta etapa de desarrollo, se toman 3 discos de la nervadura central de las hojas externas de varias plantas de la progenie. Estos discos de nervadura se incuban de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7. Se muestra que las plantas de la progenie del mutante que anteriormente mostraron ser fuertemente reducidas en la decoloración rosa inducida por herida también están fuertemente reducidas en el pardeamiento de la nervadura central inducido por herida. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 14.

#### EJEMPLO 10

40 *Evaluación de la descendencia de un mutante que muestra la casi ausencia de decoloración en relación con la respuesta reducida de pardeamiento usando cabezas de lechuga recién cortadas envasadas en bolsas de plástico.*

45 Cabezas maduras de las plantas de lechuga cultivadas a partir de semillas número 06D.819784 del Ejemplo 6, que es significativamente reducida en decoloración rosa de las superficies heridas de discos de hoja, se cortan en trozos utilizando un cuchillo y se envasan en una bolsa de plástico que contiene una atmósfera ambiente. Las plantas testigo que muestran una respuesta de decoloración rosa de disco de hoja normal fueron tratadas de idéntica manera. Las bolsas se almacenaron a 4 °C durante 6 días después de los cuales se evaluó el material de la hoja en relación con su respuesta de pardeamiento.

Se demuestra mediante este experimento que las plantas de la progenie del mutante que anteriormente mostraron ser fuertemente reducidas en la decoloración rosa inducida por herida son también fuertemente reducidas en el

pardeamiento de la nervadura central inducido por herida cuando se procesa y se almacena en bolsas de plástico usando una atmósfera ambiente. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 15.

#### EJEMPLO 11

*Enrojecimiento en Cichorium.*

- 5 Con el fin de identificar mutantes con bajo potencial de enrojecimiento enzimático inducido por herida, el ensayo de disco de hoja descrito en el Ejemplo 2 fue aplicado a plantas de una población de *Cichorium* mutante. Los resultados se muestran en la Figura 16. Se desprende que también en *Cichorium* está presente la reacción de enrojecimiento. El método de cribado de la presente invención es por tanto una potente herramienta para seleccionar plantas de *Cichorium* que muestran una reducida decoloración inducida por herida. Hasta ahora la evaluación de la respuesta de pardeamiento en endivia y endivia *witloof* (de Bruselas) pudo hacerse solamente observando plantas maduras. El método de la presente invención que puede ser llevado a la práctica en material vegetal joven es muy eficiente y rápido.

#### EJEMPLO 12

*Decoloración en berenjenas.*

- 15 Se cortaron las berenjenas por la mitad y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. De la Figura 18 se desprende que la respuesta de decoloración está provocada principalmente por las semillas. Así pues, las semillas son un adecuado candidato para un ensayo de decoloración basado en el sustrato, por ejemplo con L-DOPA.

#### EJEMPLO 13

- 20 *Diagnóstico de cribado fenotípico para la decoloración inducida por herida de la lechuga, basado en la conversión del ácido clorogénico.*

Se incubaron discos de hoja de lechuga con ácido clorogénico 10 mM sobre papel de filtro. La Figura 17 muestra el pardeamiento de los discos. Al añadirse L-cisteína el color desapareció de nuevo indicando que la decoloración depende de la PPO.

- 25 Este ejemplo demuestra que el ácido clorogénico es un sustrato adecuado para un ensayo de cribado basado en el sustrato.

#### EJEMPLO 14

*Diagnóstico de cribado fenotípico basado en el sustrato para la decoloración inducida por herida para semillas.*

- 30 Se incubaron semillas de lechuga y berenjena con L-DOPA 0, 2,5 y 5 mM. La Figura 19 muestra que la reacción coloreada observada en las semillas es dependiente de la concentración. La respuesta es dependiente de la PPO porque puede ser inhibida con L-cisteína.

Semillas de lechuga germinadas se incubaron con L-DOPA. La figura 20 muestra que el revestimiento de la semilla y la zona de la raíz justo detrás de la punta radicular muestran una reacción de coloración. Esta reacción de coloración puede ser usada para cribar semillas que muestran una decoloración reducida.

- 35 Se incubaron semillas de lechuga con 0, 100, 250, 500, 750 y 1.000 mg/L de catecol. La Figura 21 indica que las semillas muestran una respuesta de coloración dependiente de la concentración. La respuesta es dependiente de la PPO porque se encontró que se inhibía por la L-cisteína.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para el cribado de una población de plantas o partes de plantas en relación con la presencia en la misma de individuos que muestran una decoloración reducida en comparación con una planta o parte de una planta testigo, el cual método comprende:
  - 5 a) proporcionar una población de plantas o partes de las plantas entre la población;
  - b) incubar las plantas o partes de las plantas que tienen una superficie herida creada sobre las mismas en un entorno acuoso para permitir que tenga lugar la decoloración en ellas o sobre ellas;
  - c) observar la decoloración en las plantas o sobre las plantas o partes de las plantas;
  - 10 d) comparar la decoloración observada con la decoloración que se observa en la planta o parte de la planta testigo para identificar las plantas o partes de las plantas que no muestran decoloración o que muestran una decoloración que es reducida en comparación con las plantas o partes de la planta testigo, en donde las plantas o partes de la planta usadas en el cribado son material vegetal joven.
2. Método según la reivindicación 1ª, en donde la decoloración es una decoloración inducida por herida.
3. Método según la reivindicación 1ª o 2ª, en donde las plantas son plantas de verdura, plantas frutales o plantas en flor.
4. Método según la reivindicación 3ª, en donde las plantas son plantas de verduras elegidas entre lechuga, endivia, endivia "witloof" o de Bruselas, patata, apionabo, champiñones, alcachofa y berenjena.
5. Método según la reivindicación 3ª, en donde las plantas son plantas frutales elegidas entre manzana, banana, aguacate, melocotón, pera, albaricoque y mango.
6. Método según la reivindicación 3ª, en donde las plantas son plantas en flor elegidas entre gerbera y crisantemo.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en donde las plantas pertenecen a la familia de *Asteraceae*, en particular al género *Lactuca*, más en particular a la especie *Lactuca sativa*.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en donde las plantas pertenecen al género *Cichorium* y en particular a las especies *Cichorium intybus* y *Cichorium endivia*.
9. Método según la reivindicación 1ª, 2ª o 3ª, en donde las partes de la planta se eligen entre hojas, cabezas, brotes, raíces, tubérculos, tallos, flores, frutos, semillas, semillas germinadas o piezas de las mismas y células.
10. Método según la reivindicación 7ª o 8ª, en donde las partes de las plantas son discos de hojas.
11. Método según la reivindicación 7ª o 8ª, en donde las partes de las plantas son discos del tejido de la nervadura central.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 11ª, en donde la población de plantas es una población de plantas mutantes, una colección de germoplasma o una población de plantas transgénicas.
13. Método según la reivindicación 12ª, en donde la población de plantas mutantes se obtiene por un tratamiento de mutagénesis usando productos químicos y/o irradiación.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 13ª, en donde el entorno acuoso comprende papel de filtro humedecido.
15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 13ª, en donde el entorno acuoso comprende agua o una solución.
16. Método según la reivindicación 14ª o 15ª, en donde el entorno acuoso contiene un compuesto elegido entre L-3,4-dihidroxifenilalanina, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, L-tirosina y catecol.

17. Método según la reivindicación 14<sup>a</sup> o 15<sup>a</sup>, en donde el entorno acuoso contiene un compuesto elegido entre los compuestos presentados en la Tabla 1.
18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 17<sup>a</sup>, en donde la planta testigo es una planta de la cual un disco de hoja, cuando se incubaba entre dos láminas de papel de filtro humedecido durante 7 días a 5°C, muestra una decoloración rosa alrededor de los bordes.
- 5
19. Método para el cribado de una población de plantas o partes de plantas en relación con la presencia en la misma de individuos que muestran una decoloración reducida en comparación con una planta o parte de una planta testigo, el cual método comprende:
- a) proporcionar una población de plantas o partes de las plantas entre la población;
- 10 b) incubar las plantas o partes de las plantas con un sustrato que puede ser convertido en un pigmento coloreado, para permitir que tenga lugar la decoloración en las mismas o sobre las mismas;
- c) observar la decoloración en o sobre las plantas o partes de las plantas;
- d) comparar la decoloración observada con la decoloración que se observa en la planta o parte de la planta testigo para identificar las plantas o partes de plantas que no muestran decoloración o que muestran una decoloración que es reducida en comparación con la planta o parte de la planta testigo, en donde la planta o partes de la planta para ser cribadas son un material vegetal joven, semillas o semillas germinadas.
- 15
20. Método según la reivindicación 19<sup>a</sup>, en donde el sustrato se elige entre los compuestos presentados en la Tabla 1.
21. Método según la reivindicación 20<sup>a</sup>, en donde el compuesto es L-DOPA.
- 20 22. Método según las reivindicaciones 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup> o 21<sup>a</sup>, en donde la planta o parte de la planta es herida antes de la incubación con el sustrato y se observa la decoloración de la herida o cerca de la herida.

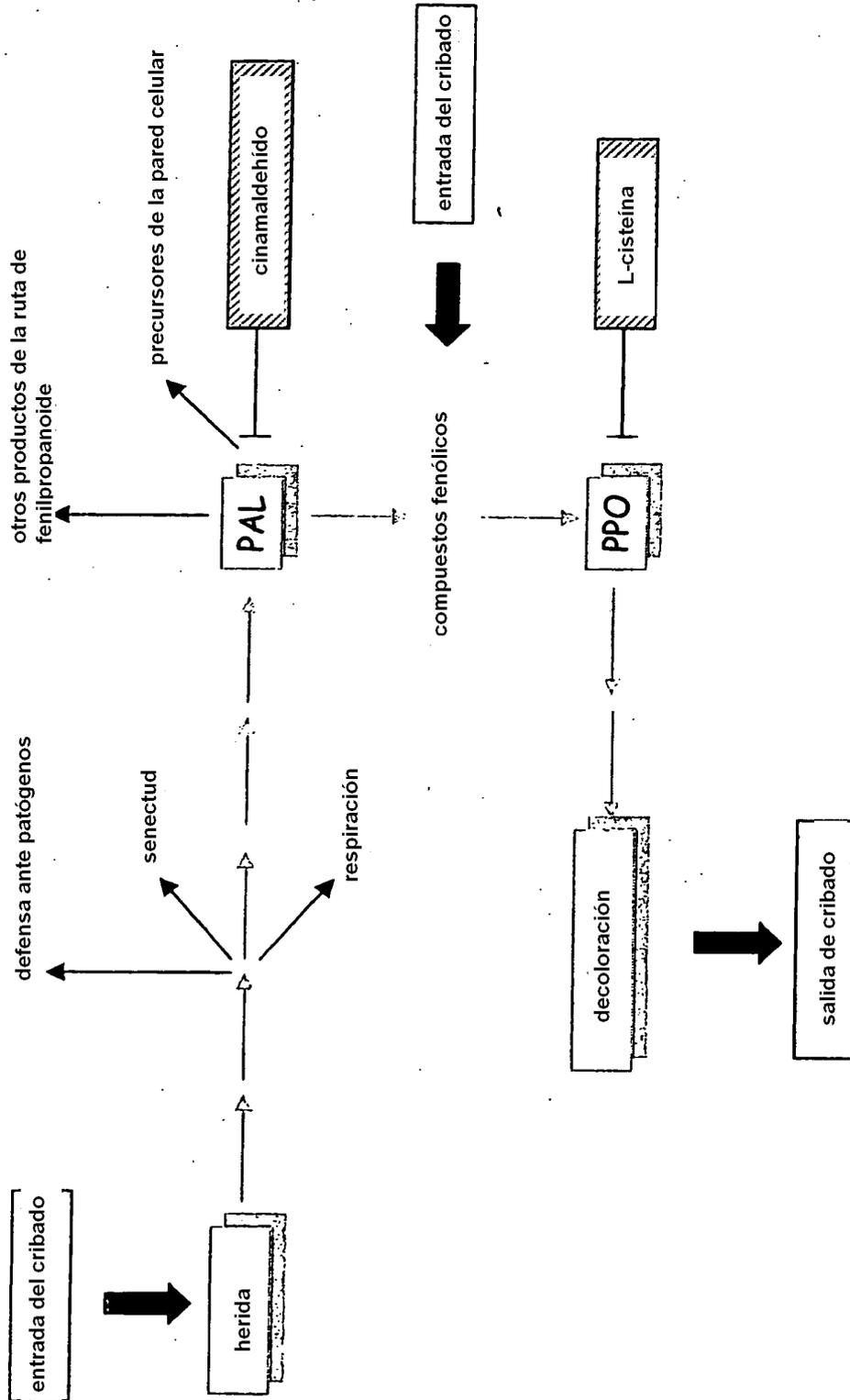


FIG. 1

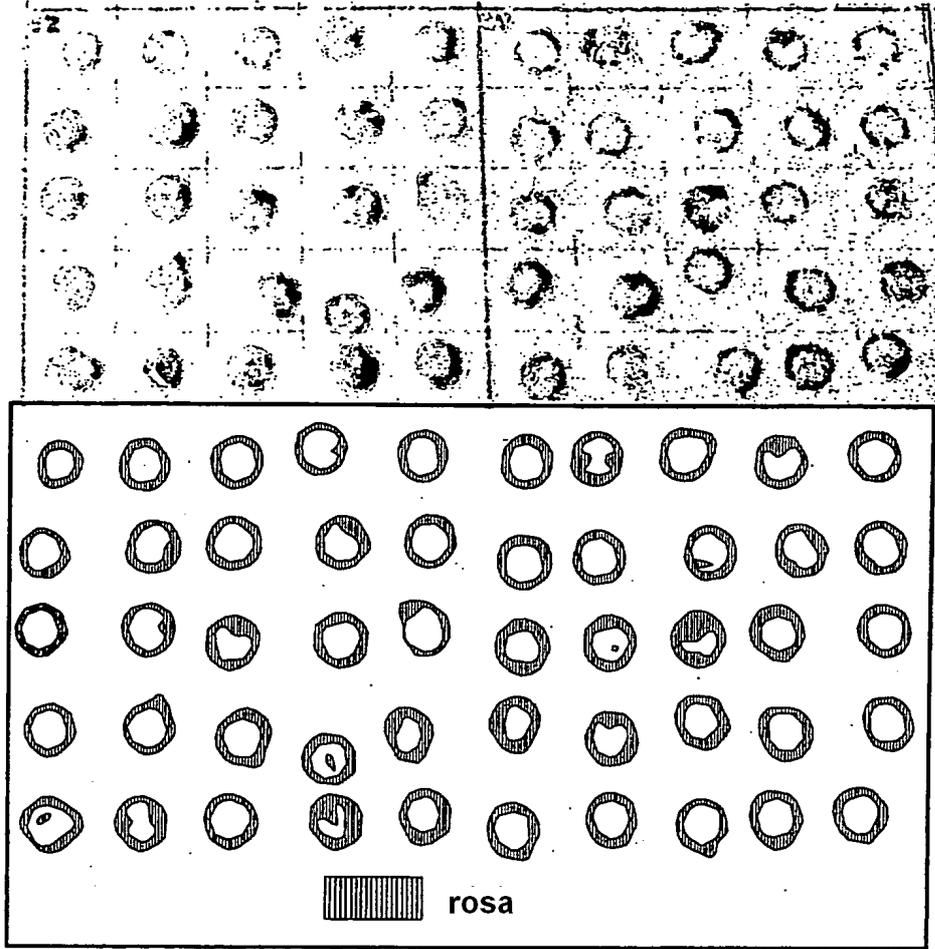


FIG. 2

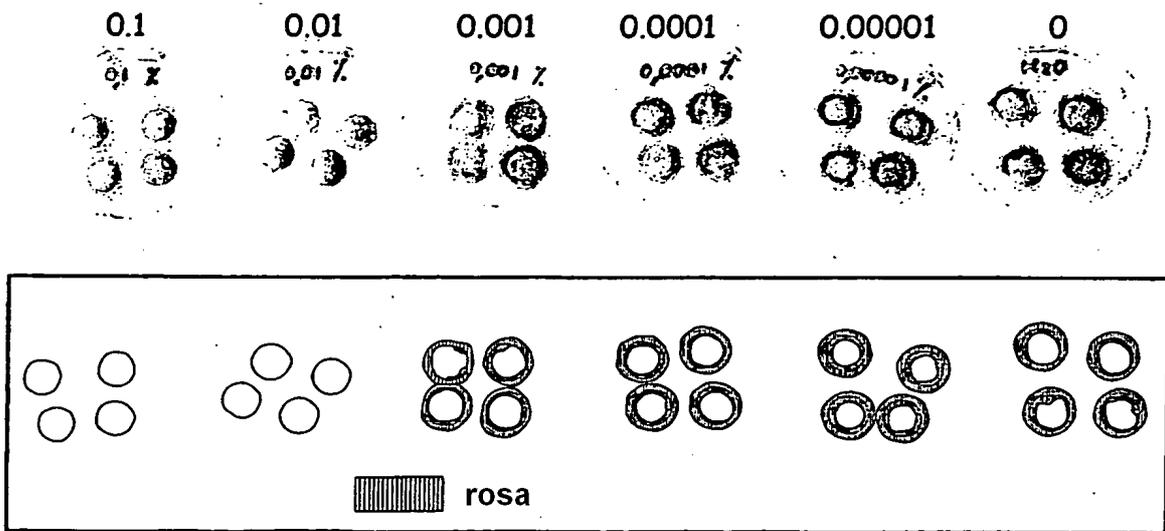


FIG. 3

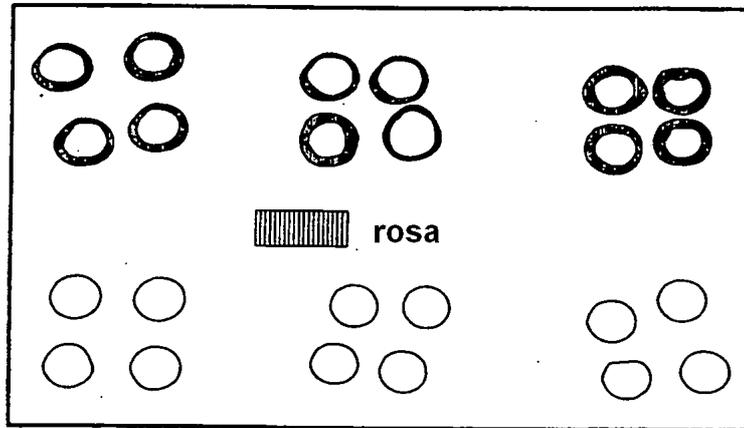
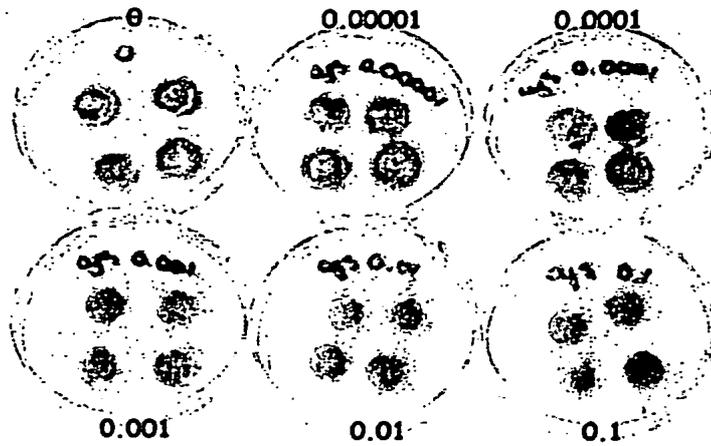


FIG. 4

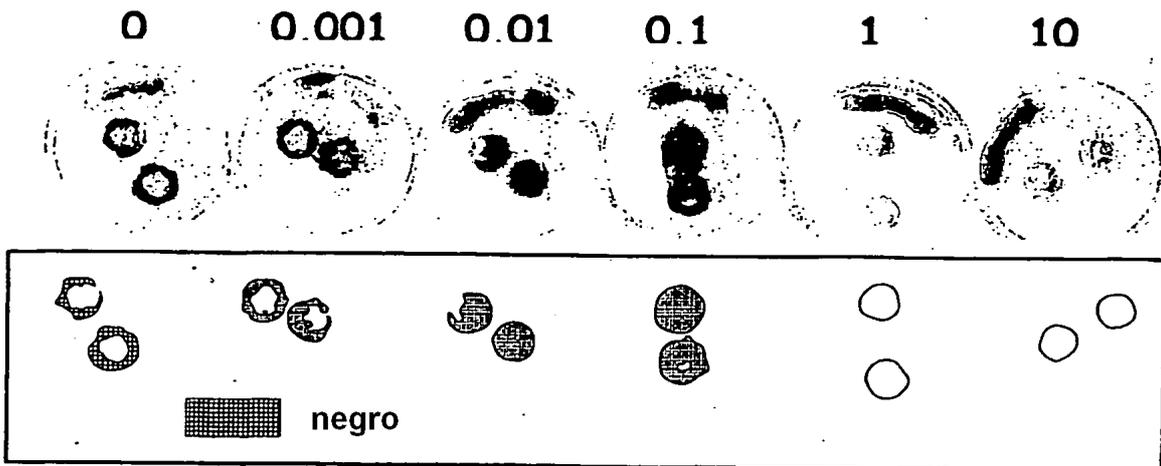


FIG. 5

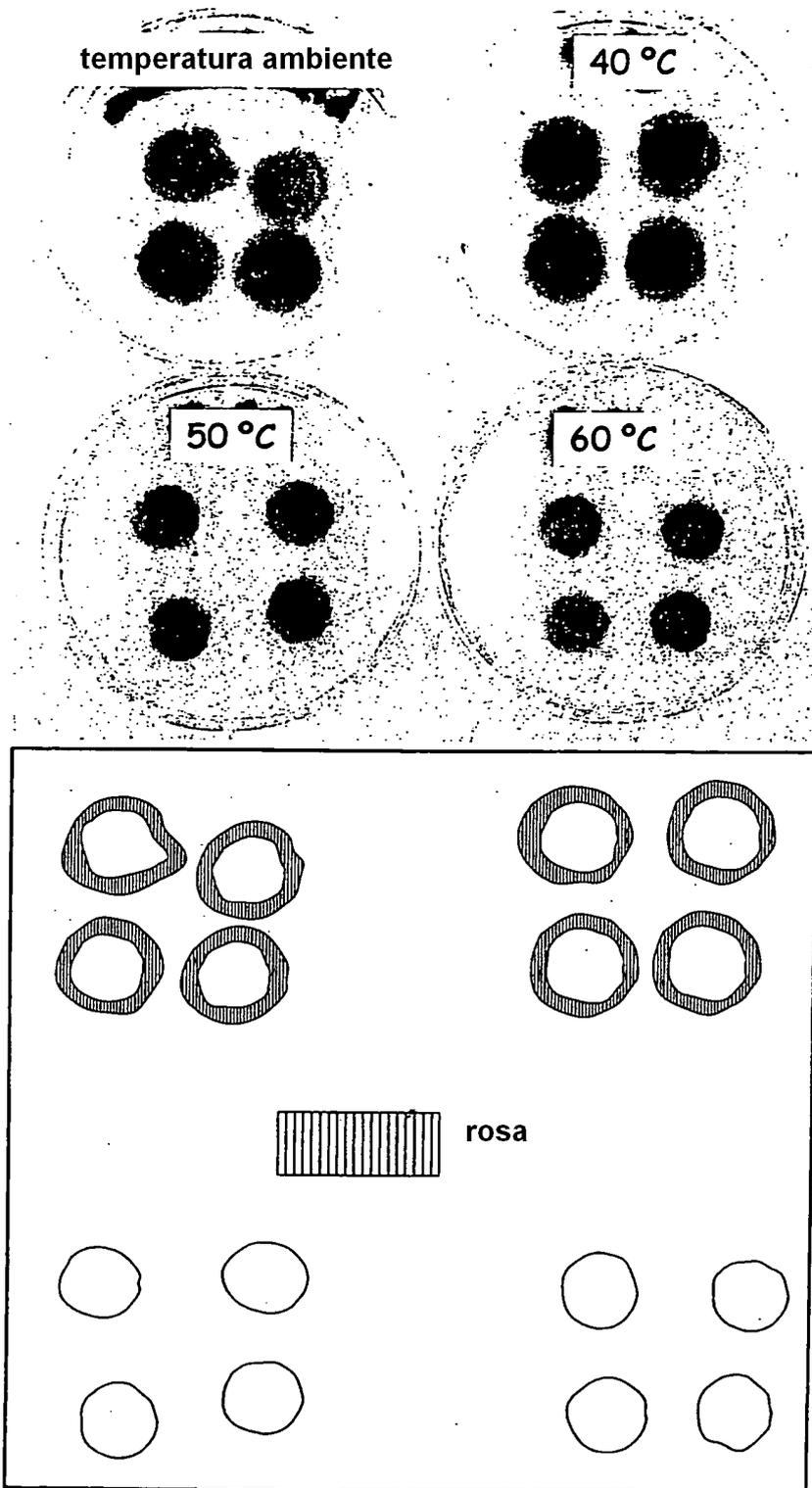


FIG. 6

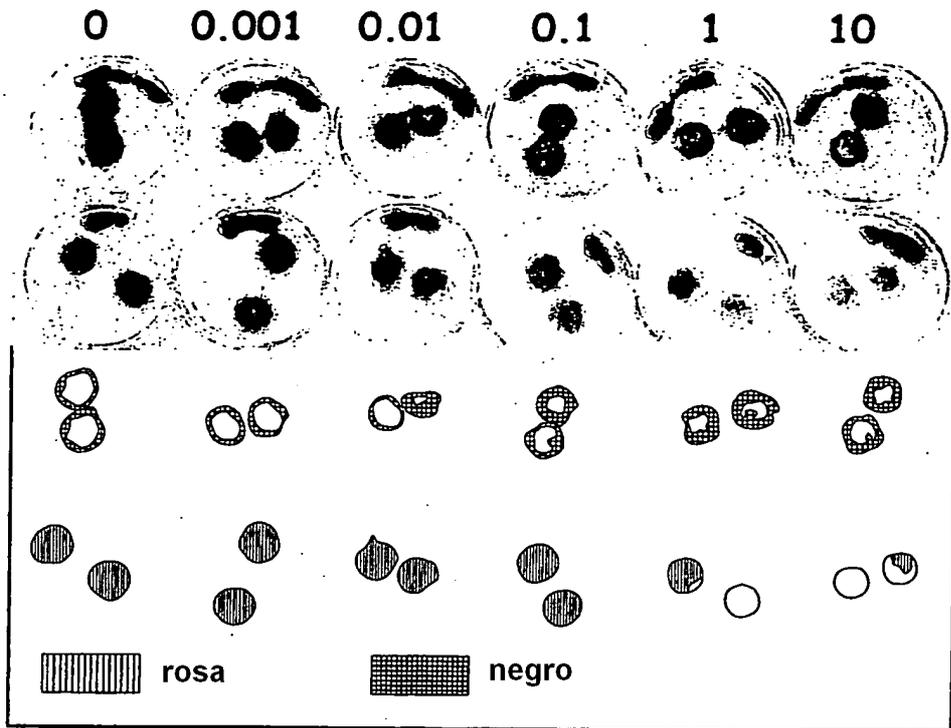


FIG. 7

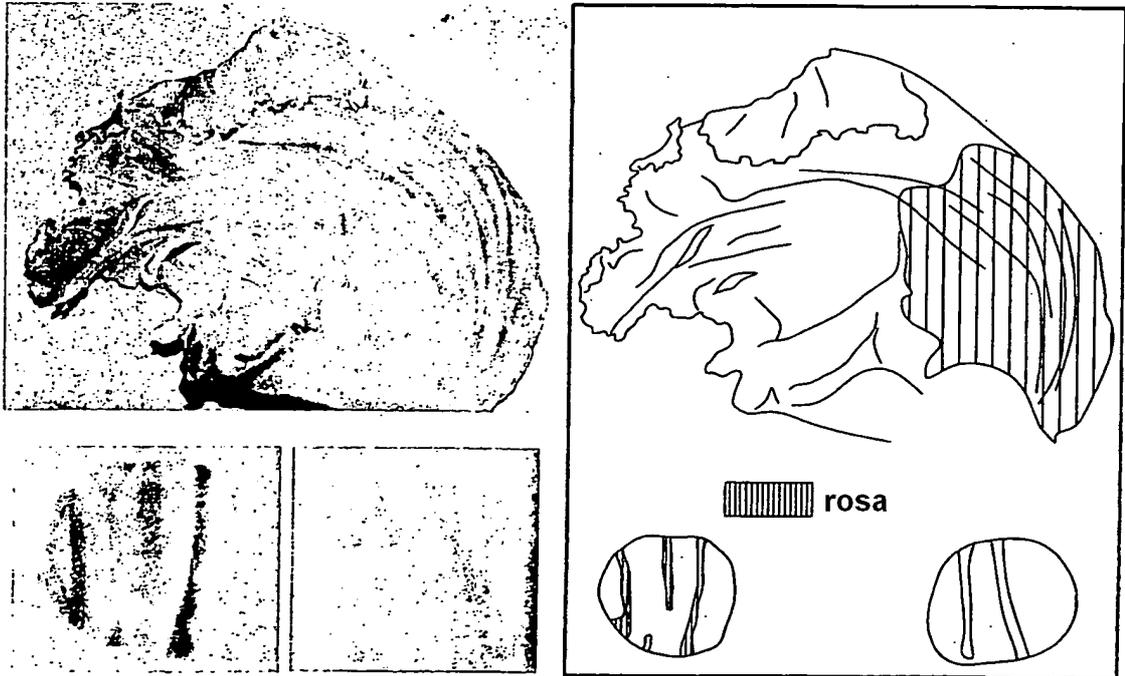


FIG. 8

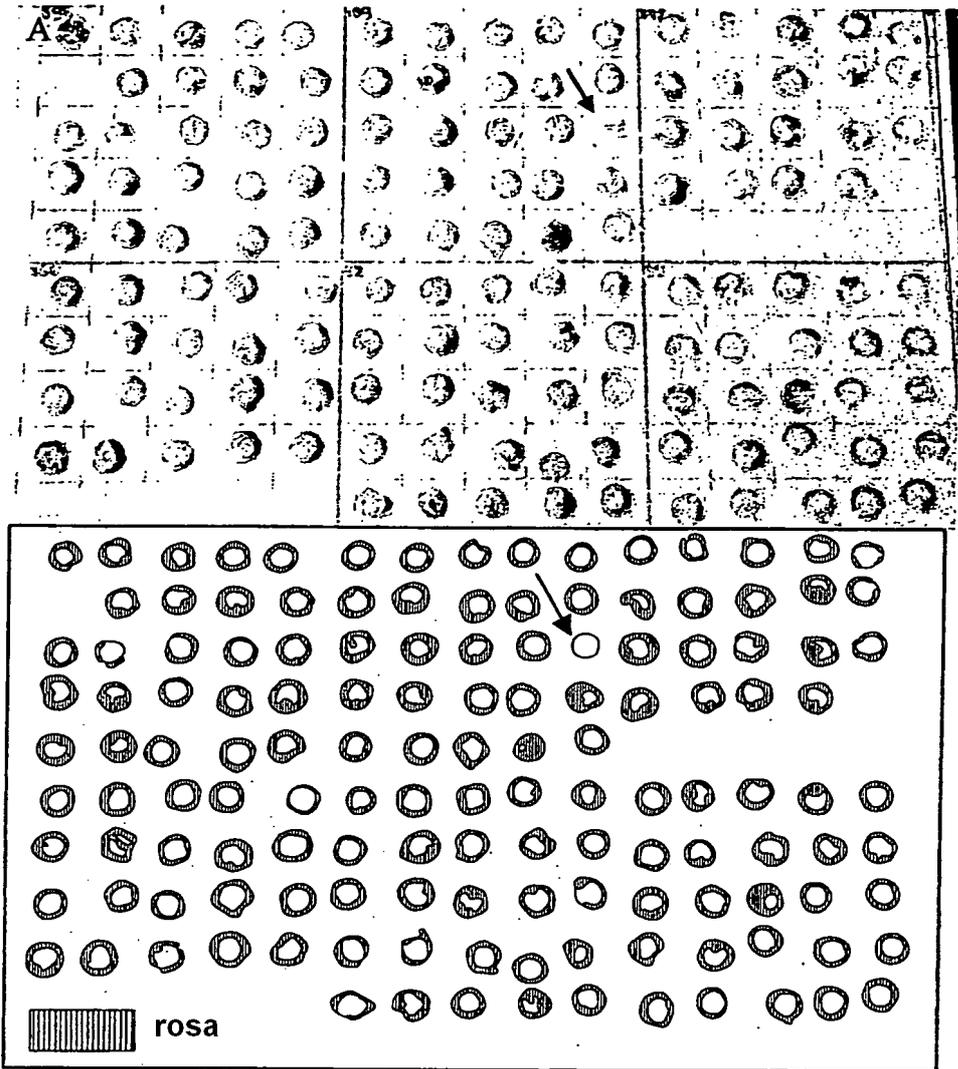


FIG. 9A

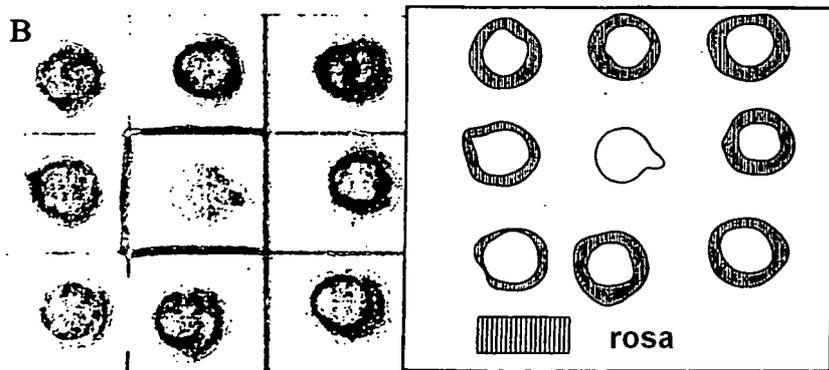


FIG. 9B

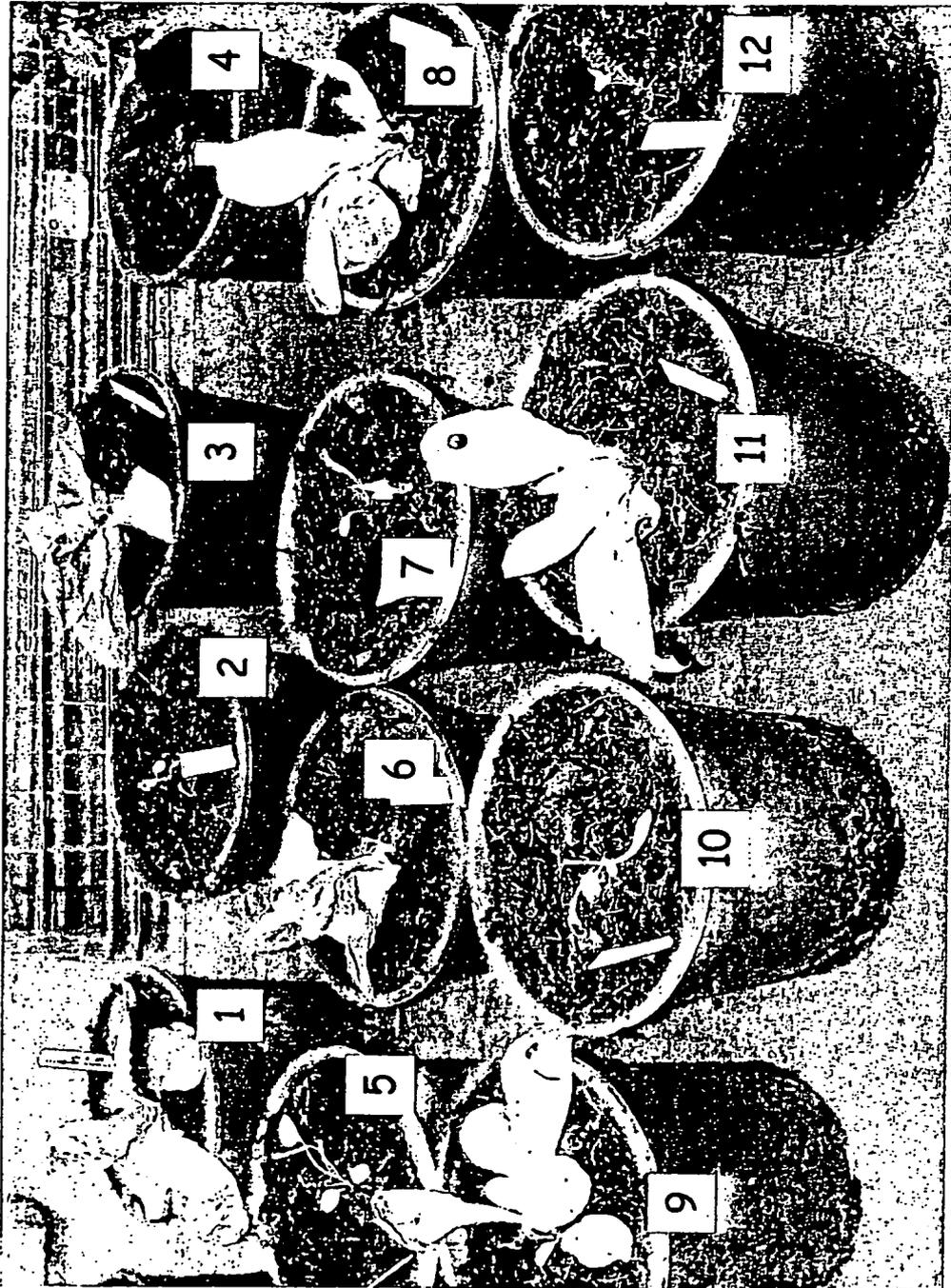


FIG. 10

Grupo testigo      Progenie derivada del mutante de  
lechuga con decoloración reducida

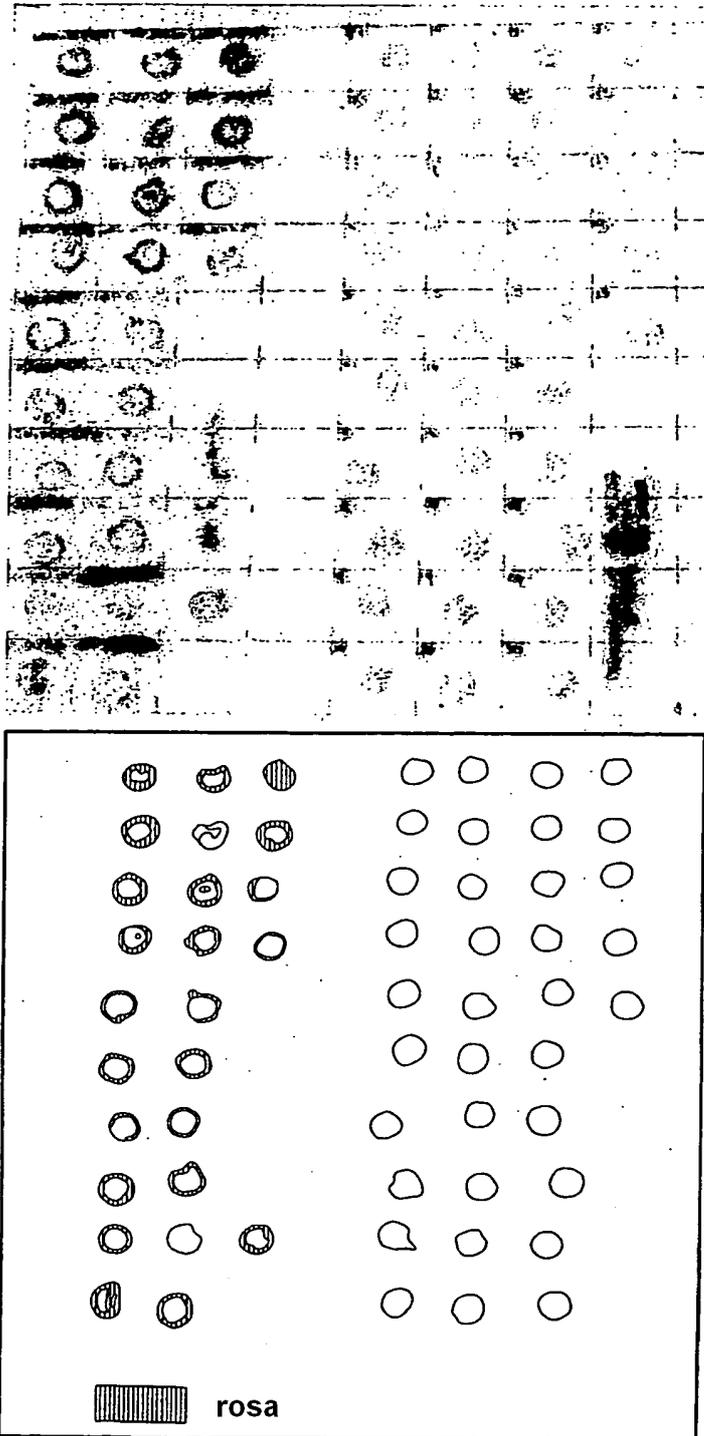


FIG. 11

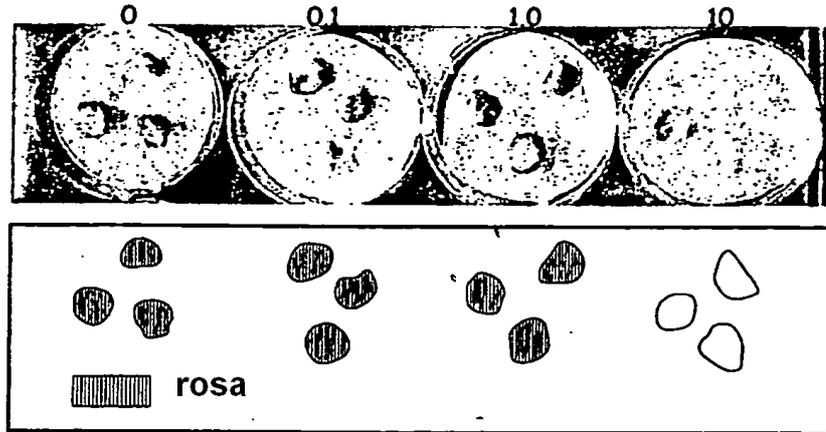


FIG. 12

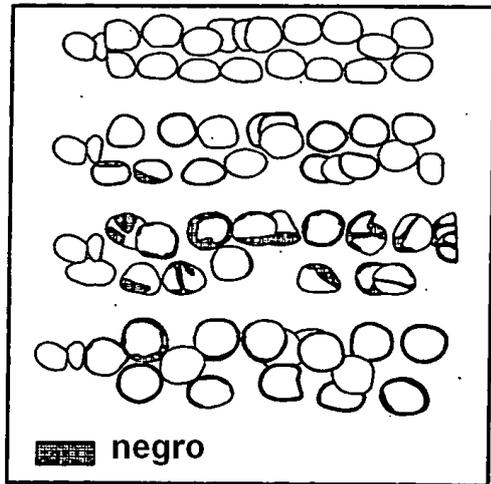
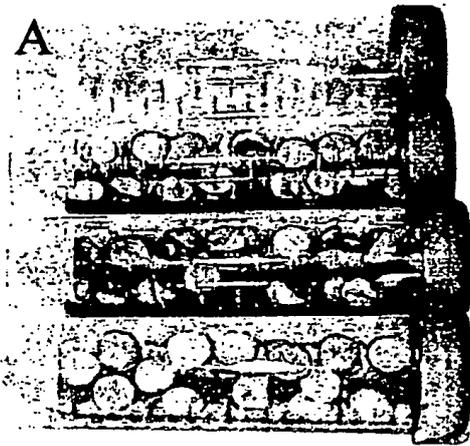


FIG. 13A

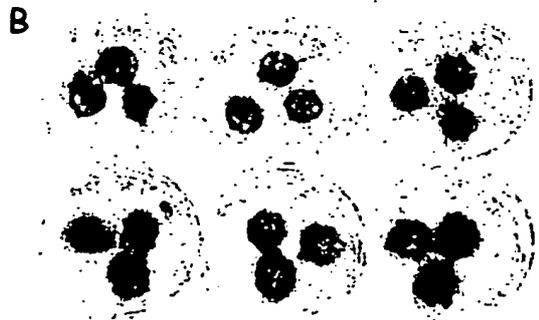
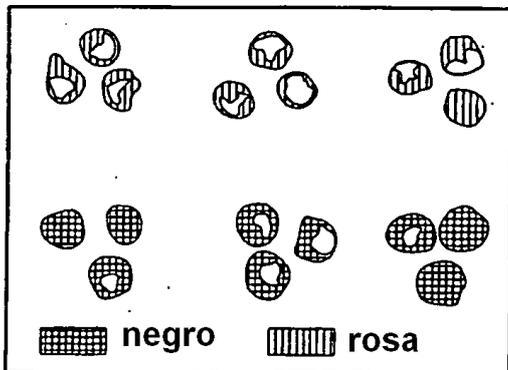
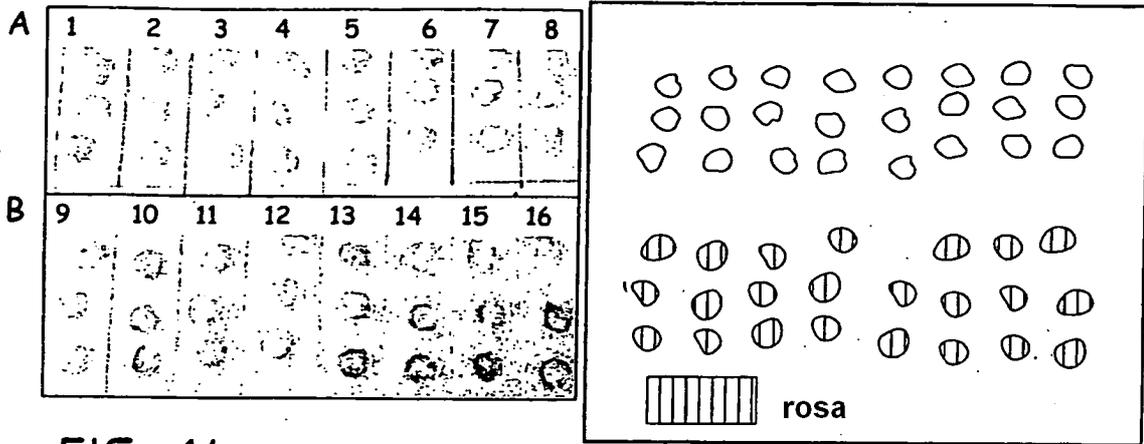


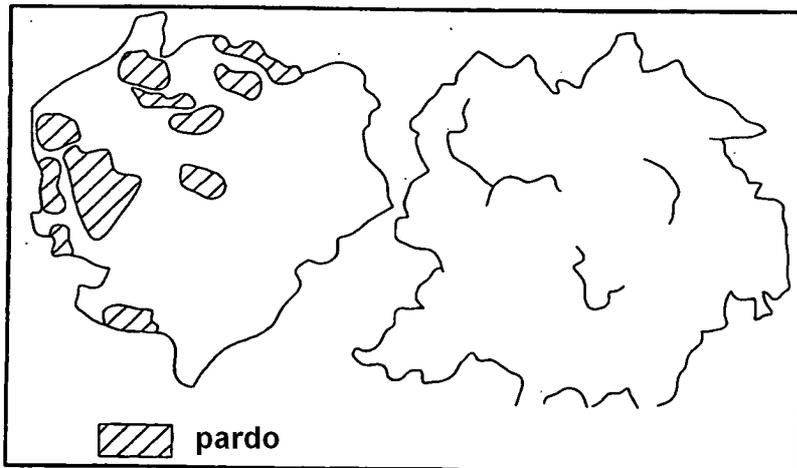
FIG. 13B



**FIG. 14**

planta  
testigo

mutante de decoloración  
reducida



**FIG. 15**

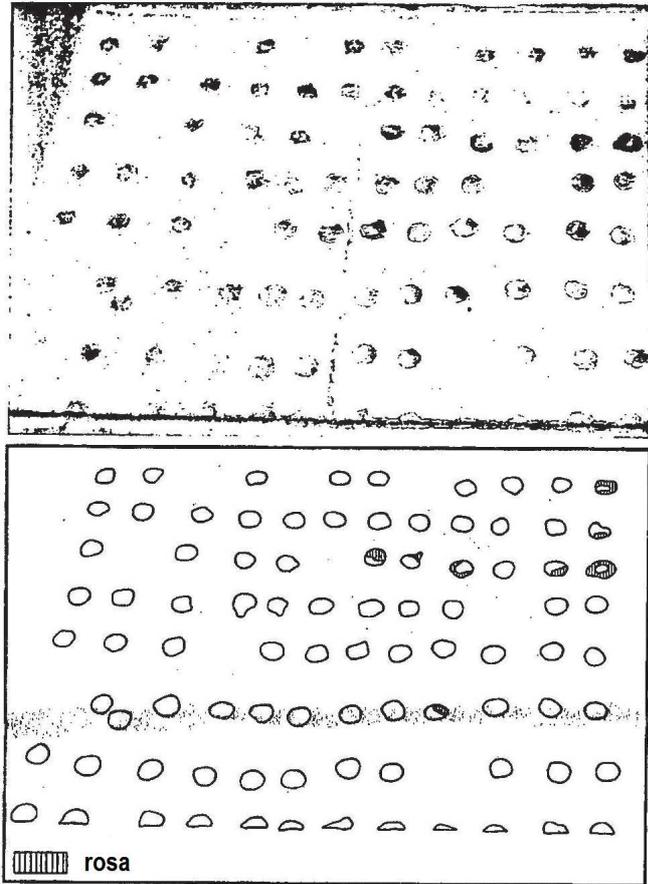


FIG. 16

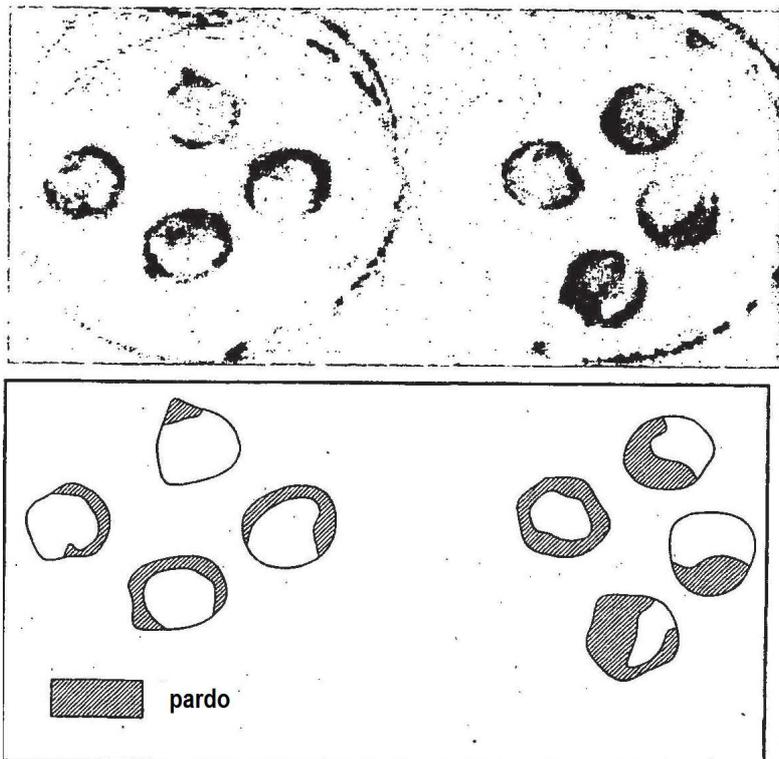


FIG. 17

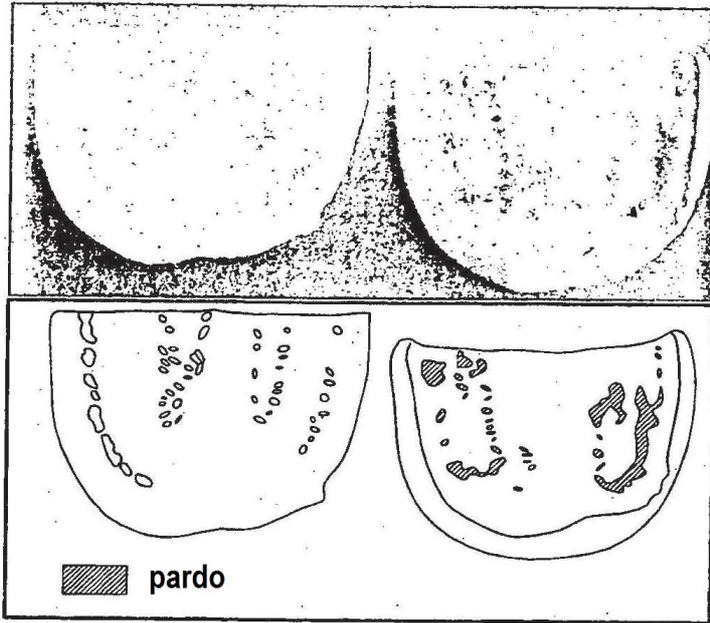


FIG. 18

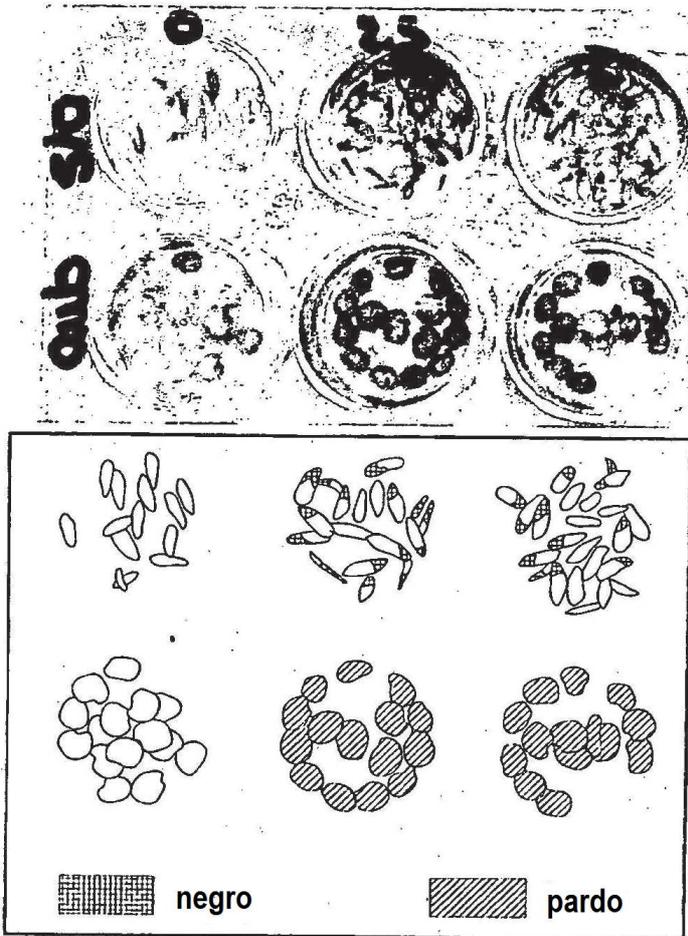


FIG. 19

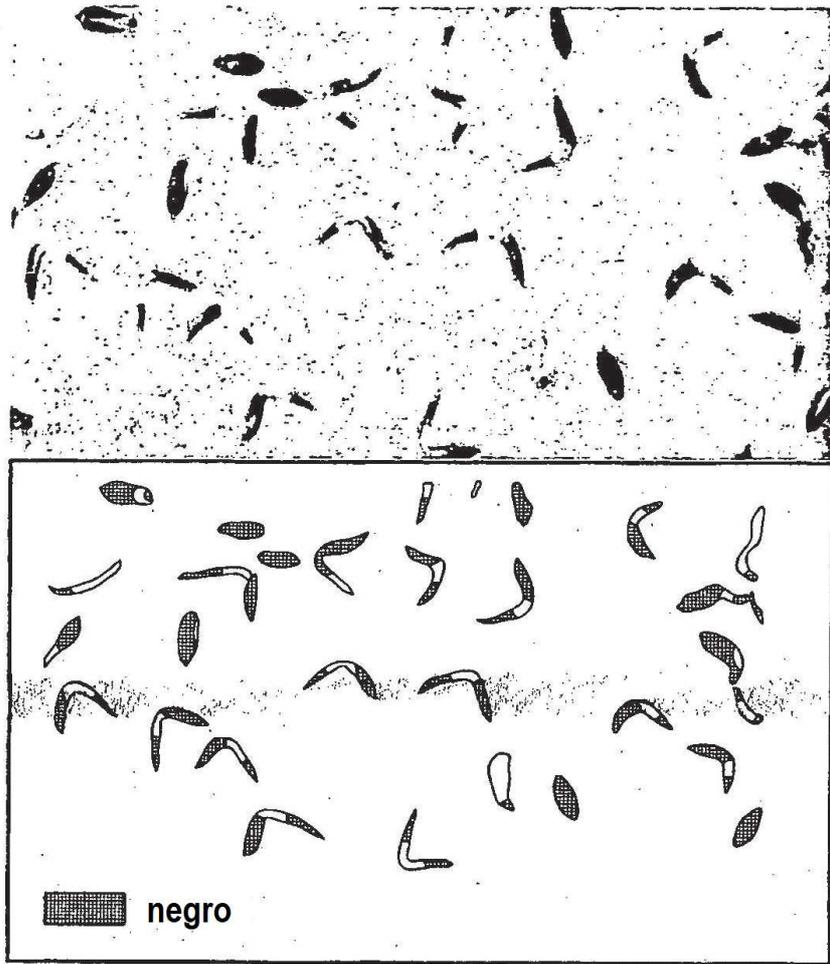


FIG. 20

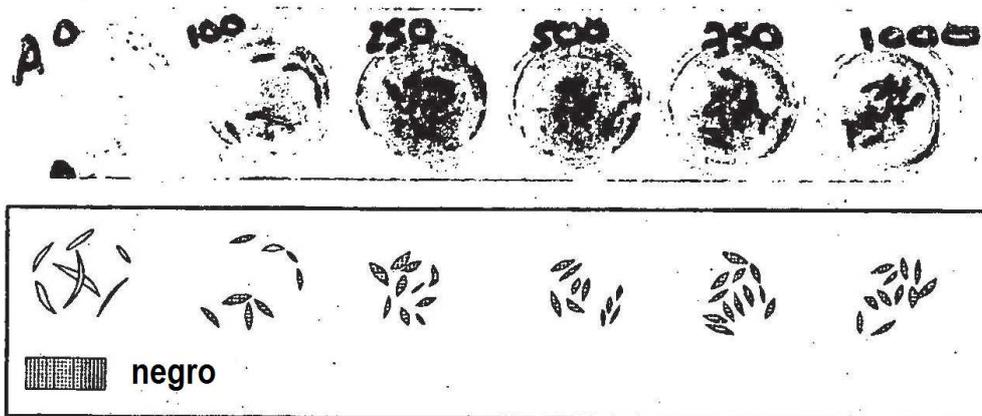


FIG. 21