

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 899**

51 Int. Cl.:

**A01H 1/00** (2006.01)

**A01H 5/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2007 PCT/EP2007/000228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2007 WO07077230**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2007 E 07702703 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 1998607**

54 Título: **Resistencia a trastornos fisiológicos en la lechuga**

30 Prioridad:

**06.01.2006 EP 06075040**

**07.12.2006 EP 06025321**

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

**27.11.2017**

73 Titular/es:

**RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.**

**(100.0%)**

**BURG. CREZEELAAN 40**

**NL-2678 KX DE LIER, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DUN, CORNELIS MARIA PETRUS;**

**VELTEROP JOYCE SYLVIA;**

**SCHUT, JOHAN y**

**DIRKS, ROBERT HELENE GHISLAIN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 643 899 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

Resistencia a trastornos fisiológicos en la lechuga

**Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere a una planta de lechuga (*Lactuca sativa* L.) que presenta una respuesta alterada al etileno que conduce a una menor susceptibilidad de esta especie de cultivo al punteado pardo. La invención también se refiere a las semillas y a la progenie de estas plantas.

**Antecedentes de la invención**

- 10 El cultivo de verduras de hoja ancha, tales como la lechuga, está dirigida a la producción de variedades comerciales óptimamente adaptadas para producir productos comercializables. Deben tomarse en cuenta muchas características durante la selección que se relacionan con rasgos de entrada y de salida. Uno de los rasgos más importantes a este respecto se refiere a la calidad tras la recolección, en particular a la caducidad. El poder evitar trastornos fisiológicos y, más en concreto, el punteado pardo y el amarilleo, son elementos importantes que pueden extender la caducidad de un cultivo de lechuga o de sus partes.

- 15 El etileno es una hormona vegetal que, en general, se sabe que estimula procesos fisiológicos relacionados con la senescencia. En la lechuga, esta estimulación se evidencia a través de la formación de síntomas, tales como el punteado pardo y el amarilleo.

El trastorno del punteado pardo se caracteriza por la aparición de manchas marrones a lo largo de la nervadura central de las hojas, mientras que el amarilleo es la decoloración general de las hojas que aparece durante la senescencia como consecuencia de la degradación de la clorofila.

- 20 Aunque se sabe que las lechugas maduras producen solo cantidades muy pequeñas de etileno, las plantas son muy sensibles a esta hormona vegetal. Por tanto, los trastornos fisiológicos asociados con la sensibilidad al etilo que reducen la calidad tras la recolección de la lechuga están provocados principalmente por fuentes externas de etileno. La exposición a dichas fuentes externas puede producirse durante la recolección, el procesamiento y la conservación del producto.

- 25 Por ejemplo, cuando la lechuga se transporta o se conserva cerca de frutas que producen etileno, tales como manzanas, peras o melocotones, puede producirse un deterioro grave. Además, cuando la lechuga se procesa y se emplea en mezclas recién cortadas envasadas, pueden existir limitaciones con respecto a los ingredientes que pueden utilizarse debido a la liberación de etileno por uno o más de los ingredientes.

- 30 El punteado pardo es un trastorno fisiológico que se manifiesta por la aparición de numerosas manchas marrones a lo largo de la nervadura central de la hoja. Los síntomas de manchas marrones pueden extenderse a través de la hoja durante las etapas progresivas del trastorno. Se sabe que el punteado pardo aparece, en especial, cuando las lechugas maduras se conservan a temperaturas bajas (5 °C) en presencia de concentraciones bajas (niveles de ppm) de etileno.

- 35 La formación de los síntomas puede antagonizarse aplicando la hormona vegetal auxina o calcio. Además, las atmósferas modificadas que contienen bajos niveles de oxígeno reducen la velocidad a la cual se desarrollan los síntomas.

A nivel bioquímico, el punteado pardo parece desarrollarse como consecuencia de una estimulación local de la biosíntesis de lignina, que provoca la lignificación y el espesamiento de la pared celular alrededor del área de la hoja en que aparecerán los síntomas visuales.

- 40 La decoloración marrón está provocada por la estimulación del metabolismo fenólico. La enzima fenilalanina amoniaco liasa (PAL), que se ha demostrado que es inducida por el etileno, cataliza la primera etapa comprometida de la vía de fenilpropanoides. Los compuestos fenólicos que se forman principalmente incluyen derivados del ácido cafeico, así como una serie de flavonoides, tales como la (+)catequina y la (-)epicatequina. La posterior oxidación de estos compuestos por la polifenol oxidasa (PPO) conduce a la decoloración marrón que se observa generalmente en el punteado pardo. Por último, los síntomas pueden agravarse debido al colapso del tejido y a la muerte celular.

La senescencia es un proceso natural del desarrollo al final del ciclo de vida de la una planta o de un órgano de una planta durante el cual el metabolismo se reprograma para movilizar recursos hacia estructuras reproductivas, tales como semillas. Aunque la senescencia es un proceso del desarrollo provocado por factores endógenos, tales como la edad fisiológica, existen muchos factores exógenos que pueden modular la senescencia.

- 50 El amarilleo de las hojas, el síntoma más visible de la senescencia, es una consecuencia de la degradación de la clorofila durante una etapa relativamente tardía de la senescencia, que puede ser potenciada por el etileno en cuanto una hoja sea receptiva. Otros factores estimuladores de la senescencia muy conocidos son las heridas, la oscuridad y la deficiencia de nutrientes. Aunque el etileno es la hormona vegetal más importante que se sabe que estimula la senescencia, es posible que otras hormonas, tales como el jasmonato, también contribuyan a este

proceso.

Desde el momento de la recolección del cultivo de lechuga hasta el momento del consumo, el producto puede verse expuesto a los diferentes factores exógenos que contribuyen a la senescencia. Estos pueden ser la producción de heridas durante la recolección y el procesamiento, la oscuridad y la deficiencia en nutrientes durante la conservación, y el etileno durante el procesamiento y la conservación. Estos factores estimulan notablemente los trastornos que aparecen tras la recolección, que pueden resultar evidentes, tales como el punteado pardo y el amarilleo. Aunque estos efectos son fundamentalmente cosméticos, el producto tiene un aspecto mucho menos atractivo y, por tanto, no se puede comercializar.

Para contrarrestar estos efectos de deterioro pueden tomarse muchas medidas tras la recolección que reducen estos efectos. Por ejemplo, se pueden conservar las lechugas recolectada a temperaturas bajas para retrasar la senescencia. Aunque esto puede reducir la velocidad de aparición del amarilleo, también puede potenciar el punteado pardo. Además, pueden establecerse medidas logísticas que reduzcan el tiempo de transporte necesario desde el campo hasta el consumidor, o que eviten que la lechuga se conserve cerca de una fuente de etileno. Además, pueden aplicarse tratamientos químicos que eviten el deterioro tras la recolección, aunque la seguridad alimentaria y la aceptación por el consumidor obviamente serán un problema.

Muchas de las medidas tras la recolección tienen éxito hasta cierto punto, pero ciertamente se pueden mejorar. Además, los costes implicados pueden ser sustanciales, lo cual constituye otra razón para explorar alternativas que reduzcan la necesidad de aplicar tratamientos tras la recolección. Preferiblemente, se ha encontrado una solución genética que reduce o elimina la necesidad de tomar las caras medidas preventivas que se emplean en la actualidad para mantener la calidad tras la recolección a un nivel elevado.

Un objeto de la presente invención es proporcionar plantas insensibles al etileno que muestran resistencia al punteado pardo. Este objeto se logra según la invención mediante una planta de lechuga insensible al etileno que muestra resistencia al punteado pardo, comparada con una planta control, y dicha planta posee información genética en su genoma que es responsable de la resistencia, y dicha información genética es como la que está presente en el genoma de una planta que se ha depositado con el número de registro NCIMB 41449, NCIMB 41450, NCIMB 41448, NCIMB 41451, NCIMB 41452 o NCIMB 41453, y puede obtenerse a partir de una planta cultivada a partir de las semillas depositadas mediante el cruzamiento de una planta con una planta cultivada a partir de las semillas depositadas, y la selección de las plantas resultantes del cruzamiento para la resistencia al punteado pardo mediante la conservación de las lechugas maduras recolectadas de las plantas en un recipiente cerrado a una temperatura de 8 °C en la oscuridad y su exposición a gas etileno a una concentración de entre 6 y 7 volúmenes en partes por millón, y la evaluación de la presencia de síntomas del punteado pardo después de 7 días.

En la presente también se describe un método para seleccionar una población de plantas para determinar la presencia en ella de individuos que muestren una susceptibilidad reducida al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo, comparado con una planta control, comprendiendo dicho método:

- a) proporcionar una población de semillas;
  - b) hacer germinar las semillas en la oscuridad y en presencia de etileno para obtener plántulas;
  - c) seleccionar las plántulas que muestran unos hipocotilos más largos que los hipocotilos de un control sensible al etileno;
  - d) autofecundar las plántulas seleccionadas para producir semillas;
  - e) hacer germinar una parte de las semillas producidas de cada plántula seleccionada en la oscuridad y en presencia de etileno y otra parte de las semillas de cada plántula seleccionadas en la oscuridad al aire ambiental; y
  - f) medir el crecimiento relativo de los hipocotilos de las plántulas germinadas en etileno frente al crecimiento de los hipocotilos de las plántulas germinadas al aire ambiental para distinguir las plantas que tienen un hipocotilo más largo, comparado con el control sensible al etileno original, germinado en etileno y al aire ambiental, de las plantas que tienen un hipocotilo más largo, comparado con el control sensible al etileno original germinado solo en etileno,
- en el que las plantas que tienen un hipocotilo más largo, comparado con el control sensible al etileno original germinado solo en etileno, se identifican como plantas que muestran una menor susceptibilidad al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo.

La invención se basa en la hipótesis de que las plantas insensibles al etileno, en particular, la lechuga, serán resistencias a trastornos fisiológicos tras la recolección, tales como el punteado pardo.

El método, tal como se describe en la presente, comprende la etapa adicional de ensayar las plantas que se han identificado, en las etapas previas, como que muestran una menor susceptibilidad al etileno, para determinar su resistencia al punteado pardo.

La longitud del hipocotilo y la longitud de la raíz pueden observarse en comparación con el patrón, y puntuarse como 1, que significa igual a la variedad patrón sensible al etileno germinada en etileno, hasta 3, que significa igual a la

5 variedad patrón sensible al etileno germinada al aire ambiental. Si se desea, pueden realizarse mediciones en milímetros. Empleando una de estas mediciones, puede realizarse un análisis estadístico simple, tal como un ensayo de la t, muy conocido por los expertos en la técnica, para determinar si una planta o un grupo de plantas es significativamente menos sensible al etileno que el patrón sensible al etileno, como, por ejemplo, cv. "Troubadour" (Rijk Zwaan, De Lier, Países Bajos). El nivel de significancia aplicado de un ensayo unilateral es de 0,001.

Para los mutantes, la comparación estadística se realiza preferiblemente entre las longitudes de los hipocotilos y, opcionalmente, las longitudes de las raíces de la variedad original que se empleó para el tratamiento de mutagénesis, que es el mejor patrón disponible, y las longitudes del hipocotilo y de las raíces de los mutantes individuales y/o su descendencia.

10 Para descubrir plantas insensibles al etileno en un material vegetal existente, se seleccionan una o más muestras representativas de variedades, líneas de reproducción y/o números de registro de bancos de genes. Después se realiza una comparación estadística de modo apropiado entre las longitudes de los hipocotilos y de las raíces del número de registro individual que se está investigando y el resto de la población. Cuando se ensayan individuos estadísticamente para descubrir hipocotilos y/o raíces significativamente más largos, pueden ser necesarios ensayos de comparación múltiple para mantener los niveles de significancia globales apropiados, por ejemplo, un ensayo de comparación múltiple de Dunnett con un patrón (Dunnett, C.W., J. Amer. Statist. Assoc., 50:1096-1121 (1955)).

Las plantas que se van a seleccionar son plantas que pertenecen a la especie *Lactuca sativa*.

20 La población de plantas preferiblemente es una población de plantas mutantes, porque las probabilidades de encontrar una planta insensible al etileno en dicha población variante son mayores. Sin embargo, mediante el método puede seleccionarse cualquier otra población de plantas que difieran en su constitución genética.

La población de plantas mutantes se obtiene preferiblemente mediante un tratamiento de mutagénesis empleando productos químicos y/o irradiación. Los tratamientos de mutagénesis son muy conocidos y se describirán con más detalle a continuación.

25 La concentración de etileno en la etapa b) es de al menos 10 µg/litro, preferiblemente entre 11 y 25 µg/litro. La concentración de etileno en la etapa d) es de aproximadamente 4 a 5 µg/litro.

30 La etapa de selección en el método de selección, tal como se describe en la presente, se basa en el alargamiento de los hipocotilos. La exposición de las plántulas germinadas en la oscuridad al etileno provoca el hinchamiento radial del hipocotilo y la inhibición del crecimiento de las raíces y del hipocotilo. Este fenómeno se denomina en general la respuesta triple (véase, por ejemplo, Guzmán, P. y Ecker, J., Plant Cell, 2:513-523 (1990)). La reproducibilidad de esta respuesta permite seleccionar mutantes que muestran una respuesta triple alterada en presencia o en ausencia de etileno. Además o en lugar de medir el alargamiento de los hipocotilos, la selección según la invención puede basarse en uno o más de los otros elementos del ensayo de la respuesta triple.

35 Las plantas que muestran una menor susceptibilidad al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo, comparadas con una planta control, pueden obtenerse sometiendo una población de semillas de plantas a un método de selección, tal como se describe en la presente, y seleccionando las plantas de la población que muestran hipocotilos más largos, en comparación con un control sensible al etileno, como plantas que muestran una menor susceptibilidad al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo.

La planta de la invención es una planta que pertenece a la especie *Lactuca sativa*.

40 Con el método de selección descrito en la presente se identificaron y seleccionaron mutantes insensibles al etileno. Las semillas de estos mutantes se depositaron en NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Reino Unido, el 3 de enero de 2007, y se les asignaron los números de registro listados en la tabla 1. Los detalles acerca de la descendencia de semillas de los depósitos se indican en el ejemplo 3 y en el ejemplo 4. Estos depósitos se realizaron porque poseen la característica específica individual de una susceptibilidad significativamente menor al etileno. No se ensayaron para el criterio de DUS para el registro de variedades, es decir, la distinguibilidad, la uniformidad, la estabilidad en todas las características de registro, y no está previsto que cumplan estos criterios de ninguna forma.

Tabla 1

Planta n.º	Referencia interna (= referencia NCIMB)	n.º de registro NCIMB
00D.7856	07D.826509	41449
00D.6876	07D.826514	41450
00D.7871	07D.826502	41448

00D.6883	07D.826522	41451
00D.6896	07D.826540	41452
00D.7845	07D.826542	41453

5 Las plantas que muestran una menor susceptibilidad al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo, pueden obtenerse cruzando una planta de la invención con otra planta de la misma especie. Por tanto, la característica de "menor susceptibilidad al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo" puede introducirse en otras plantas que originariamente no presentan esa característica. El hecho de que las plantas que surgen de dicho cruzamiento sean, en efecto, plantas de la presente invención, puede ensayarse sometiendo estas plantas al método de selección descrito en la presente.

10 La invención se refiere además a la progenie de una planta progenitora de la invención que presenta una menor susceptibilidad al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo. Esta progenie puede estar alejada en muchas generaciones del progenitor. Con la condición de que la característica de "menor susceptibilidad al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo" esté presente, la planta de la progenie es una planta de la invención.

En la presente también se describen partes de las plantas de la invención. Las partes de las plantas son, por ejemplo, lechugas completas u hojas, tales como las hojas jóvenes, las lechugas procesadas o las hojas cortadas.

15 Las partes de las plantas pueden emplearse en un cultivo de tejido para regenerar plantas que presentan la menor susceptibilidad al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo, tal como se encuentra en la planta de la cual se origina el tejido para el cultivo de tejido. Estas plantas regeneradas también son parte de esta invención.

20 La invención se refiere además a las semillas de una planta de la invención, en las que la planta que puede cultivarse a partir de la semilla presenta resistencia al punteado pardo. El hecho de que las semillas y, por tanto, las plantas cultivadas a partir de ellas, conserven o no esa característica puede ensayarse con el método de selección descrito en la presente. La invención también se refiere a la posterior generación de semillas que conservan la menor susceptibilidad al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo, tal como se encuentra en las semillas originales.

25 Debe advertirse que el método de selección descrito en la presente es un método relativamente sencillo. Las plantas de la invención que presentan una menor susceptibilidad al etileno y a trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo, pueden identificarse en cualquier población variante que sea suficientemente grande. No es necesario realizar experimentos indebidos para reproducir la invención y, por tanto, no debe considerarse que las plantas de la invención estén limitadas a las que se han depositado.

30 Como resultado de su insensibilidad al etileno, el material de plantas de lechuga y las semillas derivadas de estas de la invención muestran un notable aumento con respecto a su cualidad tras la recolección que está especialmente relacionada con fenómenos asociados con la senescencia, tales como el punteado pardo.

#### Descripción detallada de la invención

35 Puesto que el etileno es la hormona vegetal más importante que estimula la senescencia, y puesto que el punteado pardo está asociado con la senescencia, se desarrolló una estrategia genética en la que se produjeron variantes genéticas y se seleccionaron para su insensibilidad al etileno. Se descubrió que esto conduce indirectamente a la identificación de mutantes en los que su senescencia tras la recolección se ve afectada.

40 Estudios detallados que emplean especies modelo vegetales, tales como *Arabidopsis thaliana*, así como especies cultivables, han proporcionado información acerca de las vías bioquímicas implicadas en la biosíntesis y la percepción del etileno. Se han caracterizado muchas formas alélicas de genes por su papel a este respecto, y han proporcionado un retrato intrincado de la función del etileno en plantas. El etileno, al igual que otras hormonas vegetales, desempeña un papel importante en muchos procesos fisiológicos que forman parte de complejas redes reguladoras interactivas.

45 La actividad espacial y temporal de la hormona se determina, de entre otras formas, a nivel de la expresión génica subyacente a la biosíntesis de etileno, la percepción de la hormona, la transducción de señales y la activación de proteínas efectoras corriente abajo.

50 Los variantes alélicos de los genes implicados a diferentes niveles pueden determinar la potencia de la respuesta, así como el nivel de diálogo con otras vías de señalización. Puesto que la biosíntesis y la percepción del etileno no están bien caracterizadas en la lechuga, y para permitir la identificación de diferentes potencias de respuesta y sus variantes alélicas subyacentes, se pensó que una estrategia no sesgada podría tener más éxito a este respecto,

comparada con una estrategia de modificación dirigida de genes.

Esta estrategia no sesgada incluye preferiblemente un procedimiento de mutagénesis aleatoria química o física combinado con un procedimiento de selección fenotípica eficaz basado en la respuesta de plántulas etioladas al etileno. Este sistema de selección basado en plántulas es mucho más eficaz en términos del número de plantas que pueden ensayarse por hora trabajada, comparado con el uso de lechugas maduras. Además, el tiempo empleado en producir un material vegetal para la selección obviamente es mucho menor en el caso de las plántulas, comparado con las lechugas maduras.

Otra ventaja de esta estrategia es el uso de condiciones de selección en la etapa de plántula como marcadores fenotípicos predictivos para el rasgo tras la recolección en generaciones consecutivas tras haber identificado un acontecimiento favorable. Existe un riesgo evidente por el hecho de que la selección en la etapa de plántula puede no conducir a variantes genéticas que expresen el rasgo seleccionado a nivel maduro tras la recolección. Además, se sabe que las hormonas vegetales, tales como el etileno, están implicadas en muchos procesos fisiológicos que pueden conducir a efectos pleiotrópicos. Estos pueden ser positivos o negativos, dependiendo del cultivo y de sus condiciones de crecimiento. Por tanto, la estrategia adoptada comprende preferiblemente las siguientes etapas:

1. Generación de una población mutante mediante el tratamiento de semillas o de tejidos de la planta con agentes mutagénicos, tal como el etanmetilsulfonato (ems) o irradiación con rayos gamma.

2. Establecimiento de una selección fenotípica eficaz, en la que la selección se basa en la respuesta de plántulas etioladas de las plantas, en particular la lechuga, al etileno, que se caracteriza por una notable reducción en el alargamiento del hipocotilo, una raíz más corta y gruesa, y una exagerada curvatura apical en forma de gancho. Esta respuesta se denomina la respuesta triple, que es típica de plántulas etioladas y que se ha descubierto que aparece a diversos grados en muchas especies vegetales cuando se exponen a atmósferas que contienen etileno (véase, por ejemplo, Ecker J., Science, 268(5211):667-675 (1995)).

3. Caracterización de los mutantes modificados en al menos un ensayo de su respuesta triple con respecto al deterioro tras la recolección, que comprende el punteado pardo y, opcionalmente, la determinación de los efectos pleiotrópicos de la modificación para excluir los efectos pleiotrópicos negativos que afectarían al valor de las plantas.

En el método de selección descrito en la presente, la población de semillas de las plantas que se va a ensayar es, por tanto, preferiblemente, una población de semillas mutantes que puede obtenerse mediante un método que comprende:

a) tratar semillas M0 de una especie vegetal que se va a modificar, con un agente mutagénico para obtener semillas M1;

b) cultivar plantas a partir de las semillas M1 obtenidas de esta forma para obtener plantas M1;

c) producir semillas M2 mediante autofecundación de la planta M1; y

d) opcionalmente, repetir la etapa b) y c) n veces para obtener las semillas M1+n.

Las semillas M1+n obtenidas de esta manera después se germinan en la oscuridad y en presencia de una alta concentración de etileno para obtener plántulas. Después, se seleccionan las plántulas que no presentan una respuesta al etileno. La respuesta que se mide es el desarrollo de hipocotilos que están alargados, comparados con los hipocotilos de una plántula sensible al etileno.

Después, la progenie de cada planta seleccionada se divide y se cultiva en la oscuridad: la mitad de la progenie con etileno y la mitad de la progenie al aire ambiental. Se mide el crecimiento relativo del hipocotilo en etileno frente al aire ambiental para cada progenie bajo ambas condiciones. Estas observaciones se emplean para distinguir a las progenies que presentan un hipocotilo más largo que el control sensible al etileno original en etileno, pero también al aire ambiental, y que, por tanto, puede concluirse que son sensibles al etileno y no son deseables, de las progenies que verdaderamente presentan una menor susceptibilidad al etileno.

Un ejemplo de un mutágeno muy conocido es ems. El ems alquila principalmente restos G de una hebra de ADN que, durante la replicación, provocan un apareamiento con T en lugar de C. Por tanto, las pares de bases GC cambian a AT a una frecuencia que se determina mediante la dosis eficaz de ems y la actividad del sistema de reparación de desapareamientos de la planta. La dosis eficaz de ems depende de la concentración utilizada, el tamaño de la semilla y otras propiedades físicas, y del tiempo de incubación de las semillas en la disolución de ems. Las semillas que han sido tratadas con ems generalmente se denominan semillas M1. Como consecuencia del tratamiento, los tejidos de las semillas M1 contiene mutaciones puntuales aleatorias en los genomas de sus células, y las que están presentes en la subpoblación de células que formará el tejido de la línea germinal (células germinales) se trasladarán a la siguiente generación, que se denomina M2. Las mutaciones o sus combinaciones que son haploinsuficientes y, por tanto, provocan esterilidad, o que inducen letalidad en el embrión, no se trasladarán a la generación M2.

Se aplica un procedimiento similar al descrito anteriormente para el uso de ems para otros agentes mutagénicos. La

población M2 puede emplearse en procedimientos de selección dirigidos a una respuesta triple menor de plántulas etioladas.

5 Otros agentes mutagénicos, en particular agentes mutagénicos alquilantes, son el sulfato de dietilo (des), la etilenimina (ei), la propano sultona, el N-metil-N-nitrosouretano (mnu), la N-nitroso-N-metilurea (NMU), la N-etil-N-nitrosourea (enu), y la azida de sodio.

Como alternativa, las mutaciones se inducen por medio de irradiación, que se selecciona, por ejemplo, de rayos X, neutrones rápidos, irradiación con UV.

10 Las mutaciones también pueden inducirse por medio de ingeniería genética, tal como mediante el uso de oligonucleótidos quiméricos, recombinación homóloga, introducción de genes diana modificados que compiten con el producto endógeno, infrarregulación a través de interferencias con el ARN, etc.

15 La tecnología que permite modificar dianas génicas que residen en el genoma de una planta de una manera específica es conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los oligonucleótidos quiméricos han demostrado ser mutágenos eficaces con un modo de acción específico. Otra estrategia consiste en modificar dianas génicas por medio de la recombinación homóloga o el transporte dirigido a genes. Empleando esta estrategia, un fragmento de un gen es reemplazado por un fragmento de ADN introducido que contiene una modificación deseada. También son factibles estrategias transgénicas en las que se introducen genes diana modificados que compiten con el producto endógeno. Esto puede conducir a efectos negativos dominantes. Además, es factible una infrarregulación específica de la expresión de genes por medio de interferencias con el ARN.

20 En el caso de emplear oligonucleótidos mutagénicos, transporte dirigido a genes o estrategias transgénicas para modificar un factor genético implicado en la función del etileno, obviamente debe conocerse la estructura primaria de los genes pertinentes. Sin embargo, en la actualidad, el conocimiento de dichos genes en la lechuga es limitado.

Pueden piramidarse alelos de menor susceptibilidad al etileno.

La producción de semillas M1 y M1+n se realiza de modo adecuado por medio de autopolinización.

25 Por tanto, la invención se refiere a plantas, que presentan en su genoma una información genética que es responsable de la menor susceptibilidad hacia trastornos fisiológicos, tales como el punteado pardo, y que se encuentra en el genoma de una planta de lechuga, tal como se lista en la tabla 1.

30 La progenie de las plantas, tal como se reivindica, también es parte de esta invención. La "progenie", tal como se emplea en la presente, pretende incluir todas las plantas que presentan la misma menor susceptibilidad, o similar, frente al etileno y a los trastornos fisiológicos, en particular el punteado pardo, que las plantas originales descritas en la presente y que se derivan de estas de cualquier forma, tal como mediante reproducción sexual, tal como autofecundación o fecundación cruzada con otra planta del mismo género, o reproducción vegetativa, tal como cortado, cultivo de tejidos, cultivo de haploides, cultivo de protoplastos, fusión de protoplastos u otras técnicas. Así, esta progenie es la primera generación de plantas identificadas según la invención, así como la primera generación de plantas obtenidas por medio de una o más de estas técnicas, pero también cada generación posterior de plantas obtenidas por medio de una o más de estas técnicas, con la condición de que las plantas obtenidas tengan menor susceptibilidad.

40 Para determinar la respuesta de las plántulas de lechuga etioladas hacia el etileno, se emplearon recipientes de plástico especialmente diseñados en los que se cultivaron las plántulas de lechuga sobre papeles de filtro en una atmósfera en la que pueden variarse los niveles de etileno. En efecto, se descubrió que las plántulas de lechuga respondían a la presencia de etileno mediante un menor alargamiento del hipocotilo que, en principio, permitiría seleccionar los mutantes insensibles al etileno en el caso de que dichos mutantes se encuentren en la población disponible y en el caso en que la insensibilidad se exprese fenotípicamente a nivel de plántula en las condiciones experimentales que se aplican.

45 Mediante el cultivo de un gran número de plántulas de lechuga etioladas a partir de una población que contiene mutaciones introducidas de modo aleatorio, se descubrió que pueden obtenerse y seleccionarse plántulas que muestran una menor sensibilidad al etileno, comparada con la sensibilidad al etileno de la población de origen. Las plántulas seleccionadas mostraban un alargamiento del hipocotilo hasta un grado comparable a la situación en que la atmósfera está compuesta por aire ambiental sin etileno. Las plántulas identificadas de esta manera se calificaron como insensibles al etileno.

50 Para confirmar que los mutantes insensibles al etileno son resistentes al punteado pardo, los mutantes identificados en la selección se ensayaron para su resistencia al punteado pardo.

55 Un ensayo de punteado pardo comprende, de modo adecuado, la conservación de las lechugas maduras recolectadas en un recipiente cerrado a una temperatura de 8 °C en la oscuridad, y su exposición a gas etileno a una concentración de entre 6 y 7 vpm (volúmenes en partes por millón) y la evaluación de la presencia de síntomas del punteado pardo después de 7 días, preferiblemente después de 9 días. De modo adecuado, se incubaba una

lechuga control sensible al etileno junto con las plantas que se van a ensayar, y el punteado pardo de las plantas que se van a ensayar se compara con esta.

Tal como se ilustra en los ejemplos, por primera vez se ha demostrado que la insensibilidad al etileno conduce a una resistencia al punteado pardo.

- 5 De modo sorprendente, las plántulas que mostraron una menor respuesta de alargamiento, comparada con las condiciones control, pero que sí mostraron un alargamiento mayor comparado con los controles sensibles, también se consideraron insensibles al etileno, aunque de forma parcial.

Los niveles variables de insensibilidad al etileno que se observaron pueden reflejar la presencia de diferentes loci mutantes o de diferentes formas alélicas de loci idénticos que afectan a este rasgo en la población original.

- 10 En el caso de una mutación recesiva, estas dos posibilidades pueden distinguirse con facilidad realizando ensayos de alelismo, que comprenden el cruzamiento de los dos acontecimientos mutantes y la determinación del fenotipo del híbrido. En el caso de alelismo de las mutaciones, la insensibilidad al etileno aparecerá en F1, mientras que este no será el caso cuando el fenotipo en los mutantes se produzca por diferentes loci recesivos.

- 15 Puesto que se aplicó una mutagénesis aleatoria como medio preferido para generar la población de origen, las mutaciones en el trasfondo genético también contribuyen a la variación en el fenotipo de las plántulas bajo las condiciones experimentales. Para discriminar entre mutaciones puntuales de diferente potencia y un efecto combinado de las mutaciones en el trasfondo genético, deben realizarse retrocruzamientos para crear trasfondos genéticos uniformes para los diferentes acontecimientos de insensibilidad al etileno. Este procedimiento también resulta pertinente para determinar si las mutaciones en loci específicos implicadas en la sensibilidad al etileno muestran efectos pleiotrópicos.
- 20

Las plantas M2 seleccionadas de esta manera basándose en una menor respuesta al etileno se emplearon para cultivar semillas M3. En algunos casos, las plantas M3 cultivadas a partir de las semillas M3 se seleccionaron por su menor sensibilidad al etileno en un ensayo de respuesta triple y se autofecundaron para producir semillas M4. Esto se repitió hasta M5 en algunos casos.

- 25 En un caso, una planta M3 cultivada a partir de una semilla M3 se seleccionó por su menor sensibilidad al etileno en un ensayo de respuesta triple, y se cruzó con un progenitor sensible al etileno y sensible al punteado pardo para obtener una semilla F1. Una planta F1 cultivada a partir de la semilla F1 se autofecundó para producir semillas F2. Una planta F2 cultivada a partir de estas semillas F2 se seleccionó por su menor sensibilidad al etileno en un ensayo de respuesta triple, y se autofecundó para producir semillas F3. Esta línea F3 se añadió al conjunto de líneas endogámicas M3 y M4. Después, las líneas endogámicas descendientes de los acontecimientos de insensibilidad al etileno se reevaluaron para su respuesta al etileno. El nivel de insensibilidad de cada línea endogámica se puntuó basándose en el crecimiento relativo de la plántula en una atmósfera que contiene etileno frente al aire ambiental. Basándose en este criterio, 12/54 líneas que antes se habían puntuado como insensibles al etileno ahora se clasificaron como sensibles. Estos falsos positivos durante la selección inicial al nivel M2 pueden eliminarse con facilidad durante la reevaluación de los acontecimientos en la siguiente generación.
- 30
- 35

Las líneas endogámicas que mostraron una insensibilidad al etileno confirmada y significativa en el ensayo del etileno se volvieron a sembrar y se cultivaron en un invernadero en condiciones normales de producción de lechugas para producir lechugas maduras que se evaluaron para el punteado pardo y el amarilleo (véanse también los ejemplos).

- 40 Como controles negativos se cultivaron plantas sensibles al etileno que procedían de la población que se empleó para seleccionar los acontecimientos de insensibilidad al etileno. De modo sorprendente, las semillas de todos los mutantes insensibles al etileno germinaron con normalidad, es decir, fueron comparables a las semillas de una planta control sensible al etileno casi isogénica cuando se planta en tierra para macetas.

- 45 Esto contrasta notablemente con la situación en otras especies vegetales, tales como *Arabidopsis thaliana*, que muestran una fuerte reducción en la capacidad de germinación cuando se plantan en tierra para macetas (Harpham, N.J.V. et al. (1991), *Annals of Botany*, 68, 55-61). Aparentemente, en el caso de la lechuga es posible cultivar mutantes insensibles al etileno según la práctica normal de cultivo que, en muchos casos, incluye sembrar en bloques de tierra para macetas o lechos cortos de tierra para macetas.

- 50 Después del cultivo, las lechugas maduras se recolectaron y se expusieron a etileno. Una semana de incubación tras la recolección de las lechugas a 8 °C en una atmósfera que contiene etileno produjo una potente inducción de punteado pardo en las lechugas de las plantas control sensibles al etileno. Sin embargo, 29 de los 37 acontecimientos de insensibilidad al etileno evaluados no mostraron señales de punteado pardo en absoluto, lo cual demuestra, de forma sorprendente, que la resistencia al etileno que se seleccionó a nivel de plántula puede reducir los trastornos fisiológicos a nivel de planta madura, incluso en la etapa tras la recolección.

- 55 La resistencia al amarilleo puede demostrarse para una serie de acontecimientos de insensibilidad al etileno en condiciones de conservación sin etileno a una temperatura subóptima. Esto resulta sorprendente porque, hasta la



fecha, la resistencia al amarilleo solo se ha indicado en presencia de etileno (Saltveit et al., *Postharvest Biology and Technology*, 27:277-283 (2003)).

5 La presente invención se ilustrará con los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar la invención de ninguna forma. Más en concreto, los experimentos en los ejemplos se realizan con lechugas, pero la invención puede aplicarse de modo más amplio a otras especies vegetales que presenten unas dificultades tras la recolección similares cuando se ponen en contacto con etileno.

En los ejemplos se remite a la siguiente figura.

10 Figura: Fenotipo de lechugas maduras después de la exposición a etileno a 8 °C en la oscuridad durante 9 días. El panel izquierdo muestra una muestra representativa de lechugas resistentes al etileno (Etileno R) y un control sensible al etileno (- control) de la variedad Troubadour. El panel derecho muestra una fotografía similar de los mutantes derivados de la variedad Apache.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Modificación genética de lechugas mediante metansulfonato de etilo (ems)

15 Semillas de las variedades de lechuga Troubadour, Apache y Yorvik (las tres de Rijk Zwaan, De Lier, Países Bajos) se trataron con ems mediante inmersión de aproximadamente 2000 semillas por variedad en una disolución aireada de ems al 0,05% (en p/v) o al 0,07% (en p/v) durante 24 horas a temperatura ambiente.

Germinaron aproximadamente 1500 de semillas tratadas por variedad por dosis de ems, y las plantas resultantes se cultivaron en un invernadero en los Países Bajos desde mayo a septiembre para producir semillas.

20 Después de la maduración, las semillas M2 se recolectaron y se reunieron en un único agrupamiento por variedad por tratamiento. Los 6 agrupamientos resultantes de semillas M2 se emplearon como material de partida para identificar las plantas M2 individuales que contenían los alelos de la menor susceptibilidad.

25 La eficacia del procedimiento de modificación genética se evaluó determinando la aparición de plantas decoloradas, lo cual indica una pérdida de clorofila debida a modificaciones en los genes implicados directa o indirectamente en la formación o la acumulación de clorofila. En los 6 agrupamientos de semillas M2 se observaron plantas individuales decoloradas, lo cual demuestra que los tratamientos aplicados producen modificaciones genéticas.

#### Ejemplo 2: Identificación de plantas de lechuga que han obtenido alelos de menor susceptibilidad al etileno

30 Se germinaron semillas de lechuga M2 sobre papel en un recipiente de plástico pequeño con una concentración de etileno de 10 20 vpm (volúmenes en partes por millón) a 16 °C en la oscuridad. Un vpm contiene 0,41 µmol/litro o 1,14 µg/litro. Los mutantes insensibles al etileno se compararon con los controles sensibles al etileno y se seleccionaron basándose en un hipocotilo y/o raíz alargados (es decir, el ensayo de la respuesta triple). Estos mutantes insensibles al etileno se cultivaron para producir líneas M3 mediante autofecundación. Estas líneas M3 se reensayaron con el ensayo de la respuesta triple para confirmar la insensibilidad al etileno.

35 Cuando una línea se segrega para la insensibilidad al etileno, se seleccionan las plantas y después se realizan uno o dos ciclos adicionales de cruzamiento endogámico y un ensayo de respuesta triple final para seleccionar las líneas insensibles al etileno homocigóticas, si es posible.

40 En un caso, una planta M3 cultivada a partir de una semilla M3 se seleccionó por su menor sensibilidad al etileno en un ensayo de respuesta triple, y se cruzó con un progenitor Troubadour sensible al etileno y sensible al punteado pardo para obtener una semilla F1. Una planta F1 cultivada a partir de la semilla F1 se autofecundó para producir semillas F2. Una planta F2 cultivada a partir de estas semillas F2 se seleccionó por su menor sensibilidad al etileno en un ensayo de respuesta triple, y se autofecundó para producir semillas F3. La línea F3 resultante se añadió al conjunto de 53 líneas endogámicas M3, M3 y M5. En este caso, la línea F3 era el único representante de la planta mutante M2 original, porque no quedaron semillas autofecundadas de esta planta.

45 Este conjunto de 54 líneas M3 y M4 del ejemplo 1 se germinaron en bloques de turba en un recipiente cerrado con una concentración de etileno de entre 4 y 4,5 vpm en la oscuridad. Se identificaron los mutantes insensibles al etileno por sus hipocotilos más largos en comparación con las variedades control sensibles (Troubadour, Apache, Yorvik, Sensai). Los resultados se presentan en la tabla 1. Cuarenta y dos de las 54 líneas que se identificaron mediante el ensayo de la respuesta triple parecieron ser al menos parcialmente insensibles al etileno en el ensayo del etileno. Estas líneas representan 40 plantas M2, porque dos plantas M2 están representadas dos veces.

La tabla 2 muestra los resultados.

Tabla 2

Respuesta al etileno de líneas mutantes en un ensayo en recipiente cerrado y un ensayo de respuesta triple (trt). Las observaciones sobre el hipocotilo y la raíz se indican por separado, cuando no se muestra una respuesta coherente. La respuesta intermedia se indica como parcial. R = insensible al etileno; S = sensible al etileno; R/S = segregante; T = Troubadour; A = Apache; Y = Yorvik; hipo = hipocotilo

parcela	semilla n.º	origen	etileno	trt	parcela	semilla n.º	origen	etileno	trt
1	YORVIK		S	S					
2	TROUBADOUR		S	S	32	01D.85755	T	R/S	R/S
3	APACHE		S	S	33	01D.85762	A	R parcial	R hipo; S raíz
4	00D.88531	Y	S	R/S hipo; R raíz	34	03D.90452	A	R	R
5	000.88539	Y	S	S	35	01D.85764	A	R/S parcial	R hipo; S raíz
6	01D.85717	Y	S	R	36	02D.90070	A	R	R
7	01D.85720	Y	S	R	37	03D.90457	A	R	R
8	01D.85732	Y	S	S	38	01D.85768	A	R	R
9	000.88533	Y	S	S	39	02D.90128	A	R	R
10	000.88538	Y	S	R	40	02D.90129	A	R	R
11	03D.74008	Y	R	S	41	02D.90130	A	R	R
12	02D.90749	Y	S	S	42	03D.90462	A	R	R
13	00D.88550	Y	S	S	43	03D.90464	A	R	R
14	01D.85739	Y	S	S	44	02D.90133	A	R	R
15	00D.88565	T	R	R	45	02D.90134	A	R	R
16	02D.91445	T	R	R	46	00D.88600	A	R/S	R
17	00D.88577	T	R/S	R hipo; S raíz	47	02D.91479+	A	R	R
18	02D.91446	T	R	R	48	01D.85772	A	R	S hipo;

19	02D.91447	T		R			49		04D.800957	A		R		R raiz
20	01D.85754	T		S?			50		02D.90091	A		R		R
21	02D.90047	T		R			51		04D.800960	A		R		S hipo; R raiz
22	01D.85758	T		R			52		04D.800963	A		R		R
23	00D.88564	T		S			53		01D.85780	A		R		R
24	02D.91442	T		R			54		01D.85756	T		R		R
25	00D.88569	T		R			55		02D.90036	T		R parcial		S hipo; R raiz
26	00D.88573	T		R			56		04D.801660	Y		R parcial		R/S hipo; S raiz
27	00D.88578	T		R			58		04D.800900	T		R		S hipo; R raiz
28	00D.88582	T		R			59		03D.90323	T		R		R
29	01D.85748	T		R/S			60		Sensai			S		S
30	01D.85750	T		S										

**Ejemplo 3: Identificación de plantas de lechuga que han obtenido alelos de menor susceptibilidad al etileno para el punteado pardo**

5 Se sembraron 37 líneas insensibles al etileno de las 42 líneas encontradas en el ejemplo 2 en un invernadero para producir lechugas maduras en condiciones normales de producción de lechugas (localización: Maasdijk, Países Bajos; siembra: 10/01/2005; transplante: 17/02/2005; recolección: 18/04/2005). Las lechugas maduras recolectadas se conservaron en un recipiente cerrado a una temperatura de 8 °C en la oscuridad. Se expusieron a gas etileno a una concentración de entre 6 y 7 vpm (volúmenes en partes por millón). Un vpm contiene 0,41 µmol/litro o 1,14 µg/litro. Después de 9 días, las plantas que mostraban punteado pardo se identificaron. Todas las plantas control, excepto Yorvik, mostraron punteado pardo. Veintinueve de las 37 líneas ensayadas no mostraron punteado pardo o mostraron un punteado pardo menor comparado con la variedad original (tabla 3).

15 Se eligieron seis líneas para la multiplicación y se depositaron en NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido. La primera línea se numera como 02D.91445. Es una línea M4 que desciende de la planta M2 Troubadour insensible al etileno 00D.7856. Una planta M4 insensible al etileno se seleccionó de 02D.91445 en el ensayo del recipiente cerrado del ejemplo 2 y se autofecundó para producir semillas M5. Se cultivaron 16 plantas M5 a partir de estas semillas para producir un conjunto de semillas M6 mediante autofecundación. Este conjunto de semillas se numera como 07D.826509 y se deposita con el número NCIMB 41449 (primera línea).

20 La segunda línea se numera como 02D.90047. Es una línea M4 que desciende de la planta M2 Troubadour insensible al etileno 00D.6876. Una planta M4 insensible al etileno se seleccionó de 02D.90047 en el ensayo del recipiente cerrado del ejemplo 2 y se autofecundó para producir semillas M5. Se cultivaron 16 plantas M5 a partir de estas semillas para producir un conjunto de semillas M6 mediante autofecundación. Este conjunto de semillas se numera como 07D.826514 y se deposita con el número NCIMB 41450 (segunda línea). Se estableció la ausencia de punteado pardo para este origen mediante el ensayo de la línea M5 03D.90323, que desciende de una planta M4 de 02D.90047.

25 La tercera línea se numera como 00D.88578. Es una línea M3 que desciende de la planta M2 Troubadour insensible al etileno 00D.7871. Se cultivaron 16 plantas M3 a partir de 00D.88578 para producir un conjunto de semillas M4 mediante autofecundación. Este conjunto de semillas se numera como 07D.826502 y se deposita con el número NCIMB 41448 (tercera línea).

30 La cuarta línea se numera como 03D.90452. Es una línea M5 que desciende de la planta M2 Apache insensible al etileno 00D.6883. Se seleccionó una planta M5 insensible al etileno de 03D.90542 en el ensayo del recipiente cerrado del ejemplo 2 y se autofecundó para producir semillas M6. Se cultivaron 16 plantas M6 a partir de estas semillas para producir un conjunto de semillas M7 mediante autofecundación. Este conjunto de semillas se numera como 07D.826522 y se deposita con el número NCIMB 41451 (cuarta línea).

35 La quinta línea se numera como 01D.85780. Es una línea M3 que desciende de la planta M2 Apache insensible al etileno 00D.6896. Se seleccionó una planta M3 insensible al etileno de 01D.85780 en el ensayo del recipiente cerrado del ejemplo 2 y se autofecundó para producir semillas M4. Se cultivaron 16 plantas M4 a partir de estas semillas para producir un conjunto de semillas M5 mediante autofecundación. Este conjunto de semillas se numera como 07D.826540 y se deposita con el número NCIMB 41452 (quinta línea).

40 La sexta línea se numera como 04D.801660. Es una línea F3 que desciende de un cruzamiento entre la planta M3 Yorvik insensible al etileno 02D.8484 y una planta de la variedad sensible al etileno Troubadour. La planta M3 02D.8484 desciende de la planta M2 Yorvik insensible al etileno 00D.7845. Se seleccionó una planta F3 insensible al etileno de 04D.801660 en el ensayo del recipiente cerrado del ejemplo 2 y se autofecundó para producir semillas F4. Se cultivaron 16 plantas F4 a partir de estas semillas para producir un conjunto de semillas F5 mediante autofecundación. Este conjunto de semillas se numera como 07D.826542 y se deposita con el número NCIMB 41453 (sexta línea).

La figura 1 muestra las plantas resistentes y control.

**Ejemplo 4: Identificación de plantas de lechuga que muestran menos amarilleo tras la recolección**

50 Se recolectaron líneas insensibles al etileno cultivadas en condiciones de invernadero según se describió en el ejemplo 3 y se conservaron las lechugas maduras recortadas en una cámara de conservación sin etileno a 8 °C. Después de dos semanas, las hojas basales de las variedades verdes control Yorvik y Troubadour comenzaron a ponerse amarillas. En ese momento e incluso una semana después, tres líneas parecieron tener menos hojas basales amarillas que sus variedades de origen, que fueron los controles utilizados en este ensayo. Estas líneas fueron numeradas como 04D.800900, 03D.90323, 04D.801660.

55 Aunque se ha indicado una relación entre el amarilleo de las hojas y la presencia de etileno (Saltveit et al. (2003), *Postharvest Biology and Technology*, 27:277-283), resulta sorprendente que incluso en condiciones sin etileno, algunas de las líneas insensibles al etileno expresan un fenotipo de menor amarilleo.

Tabla 3

Observaciones de punteado pardo en lechugas maduras después de 9 días de conservación en condiciones con etileno. 0 = ausencia de síntomas; 1 = síntomas débiles; 2 = síntomas fuertes; ND = no disponible

semilla n.º	Etileno	trt	punteado pardo	semilla n.º	etileno	trt	punteado pardo
01D.85762	R parcial	R hipo; S raiz	2	000.88565	R	R	0
03D.90452	R	R	0	02D.91445	R	R	0,5
01D.85764	R/S R parcial	R hipo; S raiz	1	000.88577	R/S	R hipo; S raiz	0
02D.90070	R	R	0	02D.91446	R	R	0
03D.90457	R	R	0	02D.91447	R	R	0
01D.85768	R	R	0	01D.85754	S?	R/S	0
02D.90128	R	R	2	01D.85756	R	R	0
02D.90129	R	R	2	02D.90047	R	R	ND
02D.90130	R	R	2	01D.85758	R	R	0
03D.90462	R	R	2	02D.91442	R	R	0
Apache	S	S	2	Troubadour	S	S	1
03D.90464	R	R	0	00D.88569	R	R	0
02D.90133	R	R	2	000.88573	R	R	0
02D.90134	R	R	2	000.88578	R	R	0
00D.88600	R/S	R	ND	000.88582	R	R	0
02D.91479	R	R	0	01D.85748	R/S	R/S	0 1
01D.85772	R	S hipo; R raiz	0				
04D.800957	R	S hipo; R raiz	0	02D.90036	R parcial	S hipo; R raiz	ND
02D.90091	R	R	0	01D.85755	R/S	R/S	ND
04D.800960	R	S hipo; R raiz	0	04D.800900	R	S hipo; R raiz	0,5
04D.800963	R	R	2	03D.90323	R	R	0
01D.85780	R	R	0	4D.801660	R parcial	R/S hipo; S raiz	0 2
Apache	S	S	2	Yorvik	S	S	0

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Una planta de lechuga insensible al etileno que muestra resistencia al punteado pardo, comparada con una planta control, en la que dicha planta posee información genética en su genoma que comprende una mutación inducida que es responsable de la resistencia, y dicha información genética es como la que está presente en el
- 5 genoma de una planta cuya semilla se ha depositado en NCIMB con el número de registro NCIMB 41449, NCIMB 41450, NCIMB 41448, NCIMB 41451, NCIMB 41452 o NCIMB 41453, y puede obtenerse a partir de una planta cultivada a partir de las semillas depositadas mediante el cruzamiento de una planta con una planta cultivada a partir de las semillas depositadas, y la selección de las plantas resultantes del cruzamiento para la resistencia al punteado pardo mediante la conservación de las lechugas maduras recolectadas de las plantas en un recipiente cerrado a una
- 10 temperatura de 8 °C en la oscuridad y su exposición a gas etileno a una concentración de entre 6 y 7 volúmenes en partes por millón, y la evaluación de la presencia de síntomas del punteado pardo después de 7 días.
- 2.- La progenie de una planta según la reivindicación 1, que presenta resistencia al punteado pardo.
- 3.- Una planta regenerada a partir de una parte de la planta según la reivindicación 1 o 2, que presenta la resistencia al punteado pardo que aparece en el progenitor.
- 15 4.- La semilla de una planta según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, en la que la planta que puede cultivarse a partir de la semilla presenta resistencia al punteado pardo.
- 5.- La progenie cultivada a partir de una semilla según la reivindicación 4.

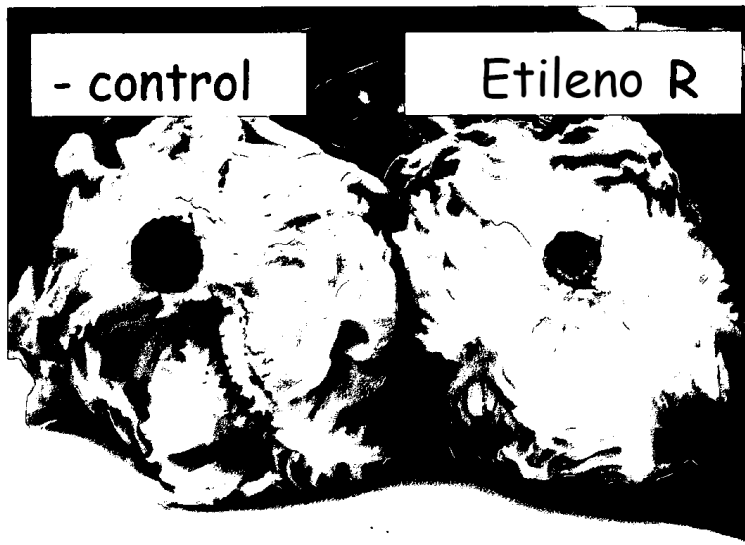


FIG. 1A



FIG. 1B