

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 143**

51 Int. Cl.:

A01H 5/10 (2008.01)

A01H 5/12 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/EP2014/055338**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14712250 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2966992**

54 Título: **Semillas de lechuga que germinan a alta temperatura**

30 Prioridad:

15.03.2013 EP 13159494
15.03.2013 US 201313836277

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2018

73 Titular/es:

RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.
(100.0%)
Burgemeester Crezeelaan 40
2678 KX De Lier, NL

72 Inventor/es:

WOUDENBERG, LEENDERT JACOBUS;
COPPOOLSE, ERIC ROLAND;
LENSSSEN, GERARDUS MARIA;
SCHUT, JOHANNES WILHELMUS y
SMITS, EGBERT CAROLUS JOHANNES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 686 143 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

Semillas de lechuga que germinan a alta temperatura

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a plantas de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), capaces de germinar a alta temperatura. La invención se refiere además a partes de las plantas, en particular las semillas, a otro material de propagación, y a la progenie de las plantas.

Antecedentes de la invención

10 La lechuga (*Lactuca sativa* L.) proviene de regiones mediterráneas donde los veranos son largos, cálidos, y secos. Las plántulas de lechuga tienen las mayores perspectivas de sobrevivencia cuando emergen de las semillas a comienzos de la primavera. Para evitar la germinación prematura durante el verano, las semillas de lechuga se equipan con un mecanismo de inactividad (o inducido) secundario llamado termo-inhibición. Durante el calor del verano, la termoinhibición impide que las semillas germinen durante un breve periodo de circunstancias propicias, tales como una sola lluvia. Solo durante el frío relativamente prolongado del invierno, la termoinhibición se alivia, lo que permite que la germinación ocurra cuando las temperaturas suben a comienzos de la primavera.

15 Durante la domesticación de la lechuga, se mantuvo la termoinhibición. La mayoría de las semillas de lechuga comerciales se inhiben de la germinación a altas temperaturas, la temperatura exacta depende del entorno de producción del cultivar y la semilla. Esto significa que los cultivares de lechuga modernos, cuando se siembran en condiciones de calor, entrarán en inactividad. Esto es especialmente problemático para las áreas de cultivo de lechuga de invierno, donde las temperaturas de germinación permisivas se superan durante la temporada de siembra de finales de verano y otoño.

20 La temperatura de germinación óptima para la mayoría de las variedades de lechuga se encuentra entre 15°C y 22°C. Para obtener semillas de lechuga capaces de germinar a temperaturas muy superiores a 22°C, las semillas se someten a un proceso de estimulación de la germinación bastante caro llamado "acondicionamiento". La semilla acondicionada permite la hidratación controlada de las semillas, permitiendo que las semillas completen las primeras etapas del proceso de germinación antes de que se sequen nuevamente hasta su contenido de humedad original, y se almacenen hasta la siembra. Uno de los principales beneficios del acondicionamiento de las semillas es la capacidad de mitigar la termoinhibición al aumentar la temperatura máxima a la que ocurrirá la germinación.

25 Aunque el acondicionamiento de las semillas puede ser beneficioso para la germinación de las semillas, es un procedimiento costoso en términos de requisitos de mano de obra y equipos, los tipos de ingredientes que se utilizan, y el tiempo necesario para la hidratación y secado de las semillas. Además, el proceso de acondicionamiento puede dar como resultado la reducción de la vida útil de las semillas acondicionadas, en comparación con las semillas no tratadas. Este efecto secundario no deseado está influenciado por la velocidad y el alcance del procedimiento de secado.

30 Además, existe un riesgo inherente de "sobre acondicionamiento" que puede provocar daños de las extremidades radicales de las semillas, y posteriormente, un crecimiento deficiente de las plántulas. El sobre acondicionamiento haría inútiles las semillas acondicionadas, por lo que la elaboración de controles de calidad de las semillas es una necesidad adicional del proceso de acondicionamiento.

35 Para desarrollar semillas de las especies *Lactuca sativa* L. que son capaces de germinar a altas temperaturas sin necesidad de acondicionamiento, el proceso costoso y potencialmente precario de acondicionamiento de las semillas se vuelve obsoleto.

40 La mejora de la capacidad de las semillas de lechuga para germinar a una alta temperatura puede también aumentar la superficie total para el cultivo de la lechuga. Las áreas del mundo con inviernos relativamente cálidos no son adecuadas para el cultivo de la lechuga, ya que las capacidades de germinación de las variedades de lechuga actuales son insuficientes para superar la termoinhibición bajo dichas altas temperaturas.

45 En un contexto más global, el aumento de las temperaturas debido a un calentamiento global puede tener un impacto considerable en la temperatura del suelo. Como tal, la alta temperatura, y el aumento resultante en la temperatura del suelo, se considera un estrés ambiental significativo que puede limitar la productividad mundial de los cultivos en un futuro cercano.

50 El objetivo de la presente invención es proporcionar semillas de lechuga con una capacidad mejorada para germinar a alta temperatura. A su vez, esto reduciría o eliminaría la necesidad de tratamientos de acondicionamiento costosos, y aumentaría potencialmente la superficie total para el cultivo de lechuga.

En la investigación que conduce a la presente invención, se desarrollaron nuevas semillas de la especie *Lactuca sativa* L. que tienen la sorprendente capacidad para germinar a alta temperatura, sin necesidad de acondicionamiento.

Dicha capacidad para germinar a alta temperatura se controla mediante un determinante genético, cuya herencia es consistente con la de un rasgo recesivo monogénico. El término “rasgo recesivo” significa en el contexto de esta solicitud que el rasgo completamente alcanzable se observa solo en semillas de una planta de lechuga que comprende el determinante genético en el estado homocigótico. Dado que la herencia del rasgo es comparable a la de un rasgo monogénico, es ventajoso que el rasgo pueda incorporarse fácilmente en varios tipos de lechuga cultivadas.

La presente invención proporciona así un lote de semillas de la especie *Lactuca sativa* L., en el que las semillas que pertenecen a un lote de semillas comprenden una mutación, que cuando se presentan homocigóticamente, proporcionan las semillas en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y cuyo lote de semillas se caracteriza porque la GT50 Dark de dicho lote de semillas es 6,2°C mayor que la GT50 Dark de un lote de semillas de semillas que no comprenden la mutación, y en donde dicha mutación está presente en semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo los números NCIMB de registro de depósito NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, y NCIMB 41926, y se localizan en el grupo de vinculación 3 entre los marcadores HTG-1 (SEQ ID NO: 1) y HTG-2 (SEQ ID NO: 2) o está presente en semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo el número de registro NCIMB 41923 y se localiza en el grupo de vinculación 3, entre los marcadores HTG-3 (SEQ ID NO: 3) y HTG-4 (SEQ ID NO: 4).

La invención también se refiere a plantas de las especies *Lactuca sativa* L. que comprenden dicha mutación, que cuando se presentan homocigóticamente en una semilla, proporcionan la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura.

Durante la investigación que condujo a la presente invención se encontró que la mutación que proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura se localiza en el grupo de vinculación 3 del mapa de vinculación genética integrado de la lechuga (Truco y colaboradores (2007) *Theoretical and Applied Genetics*, 115(6): 735-46).

En particular, en el genoma de las plantas de las que una muestra representativa de las semillas se depositó bajo los números NCIMB de registro de depósito NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, y NCIMB 41926, el rasgo de la invención está causado por la mutación de un solo gen, en donde dicho gen tiene al menos una mutación en comparación con el gen de tipo nativo correspondiente.

En otra realización, en el genoma de las plantas de las que una muestra representativa de las semillas se depositó bajo en el número NCIMB de registro de depósito NCIMB 41923, el determinante genético se localiza en el grupo de vinculación 3, y se coloca entre los marcadores HTG-3 (SEQ ID NO: 3) y HTG-4 (SEQ ID NO: 4). En particular en el genoma de las plantas de las que una muestra representativa de las semillas se depositó bajo el número NCIMB de registro de depósito NCIMB 41923, el rasgo de la invención está causado por la mutación de un solo gen, en donde dicho gen tiene al menos una mutación en comparación con el gen de tipo nativo correspondiente.

La germinación de la semilla de lechuga depende fuertemente de la temperatura. Dentro de un lote de semillas cada semilla individual puede o no germinar a una temperatura particular. Preferiblemente todas las semillas o al menos un alto porcentaje de semillas germinan a la temperatura de germinación óptima. Si la temperatura aumenta por encima de la temperatura de germinación óptima, el porcentaje de germinación de un lote de semillas disminuye drásticamente. Por lo tanto, la temperatura de germinación de un lote de semillas se puede medir en términos de la “Temperatura de Germinación 50” (GT50), que es la temperatura a la que germinará el 50% de las semillas de un lote de semillas dado. Cuando las semillas de un lote de semillas dado se exponen a temperaturas por encima de la GT50, se convierten en termo latentes o mueren. La GT50 puede diferir entre diferentes cultivares.

Un “lote de semillas” como se utiliza en esta solicitud significa, un lote de semillas producido a partir de una planta madre. Un lote de semillas consiste preferiblemente en un mínimo de 100 semillas. Cuando se utilizan menos de 100 semillas para determinar la GT50 de un lote de semillas, la GT50 se vuelve menos precisa. En particular, los lotes de semillas en el contexto de la invención, es decir, con los valores de GT50 descritos aquí, se produjeron a una latitud de 52°C, en un clima Oceánico que tiene una clasificación climática de Köppen de Cfb (McKnight & Hess, 2000. *Physical Geography: A Landscape Appreciation*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall). El punto de corte de la temperatura superior “GT50 Dark”, como se utiliza en esta solicitud significa, la temperatura a la que germinarán el 50% de las semillas de un lote de semillas dado cuando se siembran sobre papel en la oscuridad. La GT50 Dark se mide bajo condiciones de oscuridad continua (24h/día) ya que esto imita las condiciones de germinación cuando las semillas se plantan debajo del suelo o cuando las semillas se encapsulan en gránulos. La exposición de las semillas que pertenecen al lote de semillas por encima de la GT50 Dark, puede causar que las semillas se vuelvan termo latentes o mueran.

La persona experta es capaz de determinar la GT50 Dark de un lote de semillas utilizando un método de dos etapas. En primer lugar, los ensayos de germinación se llevan a cabo a diferentes temperaturas, preferiblemente entre 18°C y 42°C, para determinar el porcentaje de germinación acumulativo con el tiempo a una temperatura dada. Para cada lote de semillas que se va a ensayar, se siembran preferiblemente 100 semillas sobre un papel de filtro redondo humedecido con agua del grifo. Estos se colocan a su vez dentro de una bandeja de plástico no transparente, que a su vez está forrada con una gran pieza cuadrada de papel de filtro de remolacha también humedecido con agua del

- grifo. Se coloca un dispositivo de registro de temperatura en el papel de filtro de remolacha para registrar la temperatura de germinación real en el nivel de la semilla. La bandeja se cierra después con una tapa no transparente bien ajustada, y se coloca dentro de una bolsa de plástico oscura. La bandeja se coloca después dentro de una incubadora precalentada a la temperatura deseada. Réplicas biológicas se siembran preferiblemente en diferentes bandejas y a diferentes puntos de tiempo para eliminar cualquier sesgo relacionado con la siembra.
- Se deben tomar todas las precauciones para garantizar que los ensayos de germinación se realicen bajo condiciones de oscuridad. La configuración de los ensayos, las incubaciones y la valoración de la germinación se lleva a cabo preferiblemente dentro de una habitación termoestable, que está aislada de todas las fuentes de luz externas. Además, la habitación termoestable se enciende con, por ejemplo, luces seguras verdes (Philips TL-D 36W/17) para evitar cualquier efecto de luz sobre la germinación.
- La germinación se valora preferiblemente dos veces al día. Como se utiliza aquí, “la germinación” existe por ejemplo, cuando es visible la proliferación de radicales. La curva de “germinación con el tiempo” se puede trazar después para mostrar el porcentaje de germinación acumulativo de un lote de semillas con el tiempo, a una temperatura determinada. El porcentaje de germinación final para un lote de semillas dado a una temperatura dada se puede derivar de las curvas “Germinación con el tiempo”. Como se utiliza aquí, el “porcentaje de germinación final” es el porcentaje de germinación de un lote de semillas, después del cual no existe más germinación.
- El porcentaje de germinación final de cada curva de “Germinación con el Tiempo” se traza después para la temperatura real medida, de 18°C a 42°C (Figura 1A, 1B, 1C y 2). Se utiliza una línea del mejor ajuste por ejemplo, para ajustar los porcentajes de germinación final en una curva para cada lote de semillas. La persona experta está familiarizada con esta práctica.
- Desde la línea de mejor ajuste, se puede determinar la GT50 Dark para cada lote de semillas. La GT50 Dark corresponde a la temperatura a la que el porcentaje de germinación final se espera que sea del 50%. Cuando las semillas de un lote de semillas dado se exponen a temperaturas superiores a la GT50 Dark, se convierten en termo latentes o mueren.
- En el contexto de esta solicitud, la mutación de la invención es el elemento genético subrayado que provoca el rasgo fenotípico de la invención. El “rasgo fenotípico” es el fenotipo en el que una semilla en un estado no acondicionado tiene la capacidad para germinar a una alta temperatura en la oscuridad. “Rasgo genético”, “rasgo”, “rasgo de la invención”, y “rasgo fenotípico” se pueden utilizar indistintamente.
- En otra realización, la invención se refiere a un lote de semillas de la especie *Lactuca sativa* L. en el que las semillas que pertenecen al lote de semillas comprenden una mutación, que cuando están homocigóticamente presentes, proporcionan las semillas en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y se caracterizan además en que la GT50 Dark de dicho lote de semillas es al menos 31,8°C.
- En otra realización, la invención se refiere a semillas de lechuga que pertenecen a un lote de semillas, en donde las semillas comprenden una mutación, que cuando están homocigóticamente presentes, proporcionan las semillas en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y en donde la GT50 Dark de dicho lote de semillas es al menos 6,2°C más alta en comparación con las semillas que pertenecen a un lote de semillas que no comprenden la mutación, y en donde dicha mutación está presente en semillas de las que una muestra representativa se ha depositado bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.
- Dichas semillas comprenden una mutación, que cuando están homocigóticamente presentes, proporcionan las semillas en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, en particular a una temperatura de al menos 31,8°C.
- La GT50 Dark del lote de semillas o la temperatura de germinación de las semillas está entre 28°C y 42°C, y preferiblemente, en orden de mayor preferencia, entre 31,8°C y 42°C, entre 32°C y 42°C, entre 33°C y 42°C, entre 34°C y 42°C, entre 35°C y 42°C, entre 36°C y 42°C, entre 37°C y 42°C, entre 38°C y 42°C, entre 39°C y 42°C, entre 40°C y 42°C, entre 41°C y 42°C.
- En una realización, la invención se refiere a una planta de lechuga de la especie *Lactuca sativa* L. que lleva una mutación, que cuando está homocigóticamente presente en una semilla, proporciona las semillas en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura. La alta temperatura es como se definió anteriormente.
- En otra realización, la invención se refiere a una planta de lechuga de la especie *Lactuca sativa* L. que lleva una mutación, que cuando está homocigóticamente presente en una semilla, proporciona las semillas en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y en donde dicha mutación está presente en el genoma de las plantas cultivadas a partir de semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

Por consiguiente, una planta de lechuga de la invención es una planta que se cultiva a partir de semillas de *Lactuca sativa* L. que llevan el rasgo de la invención, o una planta de *Lactuca sativa* L. que produce semillas que llevan el rasgo de la invención.

5 En una realización, la invención se refiere a una planta de lechuga de la especie *Lactuca sativa* L. que lleva una mutación, que cuando está homocigóticamente presente, proporciona semillas en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y en donde dicha mutación se obtiene por introgresión a partir de una planta cultivada a partir de semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

10 En una realización, la invención se refiere a una planta de lechuga de la especie *Lactuca sativa* L. que lleva una mutación, que cuando está homocigóticamente presente, proporciona semillas en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y en donde dicha mutación es introgresada a partir de una planta cultivada a partir de semillas que se depositaron bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

15 "Introgresión" como se utiliza en esta solicitud pretende significar la introducción de un rasgo en una planta que no lleva el rasgo por medio del cruce y la selección.

La planta de lechuga en la que se puede introducir el rasgo de la invención puede ser por ejemplo, una planta de lechuga a partir de uno cualquiera de los tipos de lechuga cultivada de los siguientes grupos: iceberg o crisphead, escarola, romana o cos, hoja verde, hoja roja, lollo, hoja de roble, rizada, de hoja incisa, multihoja, corte, tallo, Batavia y lechuga latina.

20 Cabe señalar que la persona experta podrá identificar cualquier descendente que lleve el rasgo en una generación posterior, si el criterio o criterio de selección está claramente definido. Las plantas que llevan la mutación pueden identificarse adecuadamente entre los descendientes a partir de un cruce entre una planta que no lleva la mutación, y una planta que lleva la mutación en el estado homocigoto y de la que una semilla representativa se depositó bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926, al cultivar plantas F2 a partir de semillas que son el resultado de la etapa de cruzamiento inicial y autofecundación, permitiendo que las plantas F2 se autofecunden y produzcan las semillas F3, y realizando los ensayos de germinación en la oscuridad y a temperaturas de al menos 31,8°C en semillas de lotes de semillas F3. Para los lotes de semillas F3 dados, si aproximadamente el 100% de las semillas F3 ensayadas germinan, se puede seleccionar la planta madre F2 correspondiente que lleva la mutación en un estado homocigoto y que muestra el rasgo deseado.

Alternativamente, la selección se puede lograr a través de la identificación de la mutación, por ejemplo, por medio de uno o más marcadores moleculares. Los marcadores se pueden desarrollar de acuerdo con una persona experta en base al material que se depositó bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

En ausencia de marcadores moleculares, o en el caso que la recombinación haya ocurrido entre los marcadores moleculares y la mutación y estos ya no sean predicativos, la equivalencia de las mutaciones puede determinarse todavía mediante un ensayo de alelismo. Para realizar el ensayo de alelismo, el material que es homocigoto para la mutación conocida, una así llamada planta de prueba se cruza con material que es homocigoto para la mutación que se va a ensayar. Esta última planta se conoce como la planta donante. La planta donante que se va a ensayar sería o debería ser homocigoto para la mutación que se va a ensayar. La persona experta sabe como obtener o producir una planta que es homocigoto para la mutación que se va a ensayar. Las semillas de al menos veinte lotes de semillas F3 que surgen de las F2 del cruce entre una planta donante y una planta de prueba se germinan en la oscuridad y a temperaturas de al menos 31,8°C. Cuando aproximadamente el 100% de las semillas ensayadas de todos los lotes de semillas F3 anteriormente mencionados germinan, se observa después el fenotipo relacionado con la mutación, y se ha demostrado que la mutación de la planta donante y la planta de prueba son equivalentes o iguales.

En el caso de que más de un gen sea responsable de un cierto rasgo, y se haga un ensayo de alelismo para determinar la equivalencia, la persona experta que hace el ensayo tiene que asegurarse que todos los genes relevantes se presentan homocigóticamente para que el ensayo funcione correctamente.

La invención se refiere además a la progenie de una planta de lechuga que comprende la mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura. Dicha progenie puede ser producida por reproducción sexual o vegetativa de una planta de la invención o una planta progenie de la misma. La progenie lleva la mutación que provoca el rasgo de la invención y que se encuentra en las semillas depositadas bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926, en forma homocigota. La progenie muestra el rasgo fenotípico de la germinación a alta temperatura.

5 Cuando la mutación de la invención está presente homocigóticamente en una semilla no acondicionada de la planta progenie, las semillas tienen la capacidad para germinar a alta temperatura de la misma manera o de una manera similar a una semilla no acondicionada de la planta de la que semillas representativas se depositaron bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926. Esto significa que dicha progenie tiene las mismas características que las reivindicadas para las plantas de lechuga de la invención. Además, la planta se puede modificar en una o más características. Tales modificaciones adicionales son por ejemplo, efectuadas por mutagénesis o por transformación con un transgén.

10 Como se utiliza aquí, la palabra “progenie” pretende significar la descendencia o el primer y todos los demás descendientes de un cruce con una planta de la invención que muestra el rasgo de la invención y/o lleva la mutación que subraya el rasgo. Tal progenie se obtiene por ejemplo cruzando una primera planta de lechuga con una segunda planta de lechuga, en donde una de las plantas de lechuga se cultivó a partir de las semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo el número NCIMB de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926, pero puede también ser el progenie de cualquier otra planta de lechuga que lleva la mutación presente en las semillas de depósito NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

15 Se entiende que una planta madre que proporciona la mutación de la invención no es necesariamente una planta cultivada directamente a partir de las semillas depositadas. La madre puede ser también una planta progenie de la semilla, o una planta progenie de las semillas que se identifica que tienen (o han adquirido) el rasgo de la invención por otros medios.

20 En una realización, la invención se refiere a plantas de lechuga que llevan el rasgo de la invención y que han adquirido dicho rasgo por introducción de la información genética que es responsable del rasgo a partir de una fuente adecuada, ya sea mediante reproducción convencional, o modificación genética, en particular cisgénesis o transgénesis. La cisgénesis es una modificación genética de las plantas con un gen natural, que codifica un rasgo (agrícola) de la propia planta de cultivo o de una planta donante sexualmente compatible. La transgénesis es una modificación genética de una planta con un gen de una especie no cruzable o con un gen sintético.

25 En una realización, la fuente de la que se adquiere la información genética está formada por plantas cultivadas a partir de semillas depositadas, o descendientes sexuales o vegetativos de las mismas.

La progenie también abarca plantas que llevan el rasgo de la invención que se obtiene de otras plantas de la invención por propagación o multiplicación vegetativa.

30 La invención también se refiere a un material de propagación adecuado para producir una planta de *Lactuca* que comprende la mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y en donde dicha mutación está presente en las semillas de las que una muestra representativa se ha depositado bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

35 En una realización, el material de propagación es adecuado para la reproducción sexual. Dicho material de propagación comprende por ejemplo, microesporas, polen, ovarios, óvulos, sacos de embriones y óvulos. En otra realización, el material de propagación es adecuado para la reproducción vegetativa. Dicho material de propagación comprende por ejemplo esquejes, raíces, tallos, células, protoplastos, y cultivos tisulares de células regenerables, partes de la planta que son adecuadas para preparar cultivos tisulares, en particular hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocótilos, células meristemáticas, puntas de raíz, anteras, flores, semillas y tallos.

40 La invención se refiere además a una planta de lechuga cultivada o regenerada a partir de dicho material de propagación de una planta de la invención, cuya planta comprende la mutación como se definió aquí, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura.

45 También se describe aquí un producto alimenticio que comprende una o más partes cosechadas de plantas de lechuga de la invención, productos alimenticios que comprenden hojas cosechadas de plantas de lechuga de la invención, en forma natural o procesada, y un recipiente que comprende una o más plantas de lechuga de la invención en un sustrato de crecimiento para la cosecha de hojas de la planta de lechuga en un entorno doméstico. La parte o producto alimenticio cosechado puede ser, o comprender la cabeza y/o hojas de lechuga de una planta de lechuga de la invención. Un producto alimenticio preferido que comprende partes de la planta de lechuga de la invención es una ensalada, en donde las hojas de lechuga pueden opcionalmente mezclarse con otras hojas de por ejemplo espinacas, endivias, achicoria, remolacha, acelga, etc.

50 El producto alimenticio o la parte cosechada pueden haber sido sometidos a una o más etapas de procesamiento. Dicha etapa de procesamiento puede comprender pero no se limita a cualquiera de los siguientes tratamientos o combinaciones de los mismos: cortar, lavar, asar a la parrilla, sofreír o una mezcla de ensalada que comprende hojas de la planta de lechuga de la invención. La forma procesada que se obtiene es también parte de la invención.

La lechuga procesada puede utilizarse también en otros productos alimenticios, tales como una sopa, un sándwich, etc. Dichos productos alimenticios se pueden preenvasar y destinar a la venta en un supermercado. La invención también se refiere por tanto al uso de las plantas de lechuga de la invención o partes de las mismas en la preparación de productos alimenticios, en particular ensaladas, sopas, y sándwich.

- 5 Todos los productos alimenticios y partes cosechadas llevan en sus genomas la mutación que cuando está presente homocigóticamente conduce a la semilla que tiene capacidad para germinar a alta temperatura en un estado no acondicionado.

10 La invención se refiere además a una célula de una planta de lechuga de la invención, célula que comprende una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, en donde dicha mutación está presente en una planta de lechuga cultivada a partir de semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926. Dichas células por lo tanto comprenden la información genética que codifica el rasgo de la invención, en particular la información genética que es sustancialmente idéntica, preferiblemente completamente idéntica a la información genética que codifica dicho rasgo de la planta de lechuga cultivada a partir de semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo los números de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926, más en particular la mutación descrita aquí. Preferiblemente, la célula de la invención es parte de una planta o parte de la planta, pero la célula también puede estar en forma aislada.

20 La invención también se refiere a una célula de una planta de lechuga de la invención, célula que comprende una mutación en su genoma, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y la planta que se obtiene o es obtenida al transferir el rasgo de la invención como se encuentra en las semillas que se depositaron bajo los números de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926 en una planta de lechuga de valor agronómico.

La invención se refiere además a semillas de la planta de lechuga de la invención, semillas que contienen en sus genomas la información genética que proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura.

30 También se describe aquí el uso de semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo los números de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926 para transferir la mutación, que cuando se presentan homocigóticamente en una semilla, proporcionan la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, en otra planta de lechuga de valor agronómico.

35 Se describe además el uso de una planta de lechuga de la invención que comprende una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, como se encuentra en semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926, como un cultivo.

40 También se describe el uso de una planta de lechuga de la invención que comprende una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, como se encuentra en semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926, como una fuente de semillas.

45 También se describe el uso de una planta de lechuga de la invención que comprende una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, como se encuentra en semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926, como una fuente de material de propagación.

50 Además se describe el uso de una planta de lechuga de la invención que comprende una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, como se encuentra en semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926, para el consumo.

55 Un método para la producción de una planta de *Lactuca sativa* L. que lleva una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, que comprende

- a) cruzar una planta que comprende una mutación que conduce al rasgo con otra planta;

- b) autofecundar la F1 resultante para obtener las plantas F2;
 - c) permitir que las plantas F2 produzcan semillas F3 y germinar semillas de los lotes de semillas F3 en la oscuridad y a temperaturas de al menos 31,8°C;
 - d) seleccionar plantas que tienen la característica en la F2;
- 5 e) realizar opcionalmente una o más rondas adicionales de autofecundación o cruce, y posteriormente seleccionar, para una planta que comprende/muestra el rasgo de la invención. Las plantas que tienen el rasgo en la F2 son plantas adecuadas que producen un lote de semillas F3 en el que aproximadamente el 100% de las semillas F3 ensayadas en la oscuridad a temperaturas de al menos 31,8°C, germinan.

10 Está claro que la madre que proporciona el rasgo de la invención no es necesariamente una planta cultivada directamente a partir de las semillas depositadas. La madre puede ser también una planta progenie de la semilla o una planta progenie de las semillas que se identifican por tener el rasgo de la invención por otros medios.

Un método para la producción de una planta de *Lactuca sativa* L. que lleva una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, que comprende

- 15 a) cruzar una planta que comprende la mutación que conduce al rasgo con otra planta;
 - b) retrocruzar opcionalmente la F1 resultante con la madre preferida;
 - c) permitir que las plantas F2 produzcan semillas F3 y germinar semillas de los lotes de semillas F3 en la oscuridad y a temperaturas de al menos 31,8°C;
 - d) seleccionar para plantas que tienen el rasgo en la F2;
- 20 e) realizar opcionalmente una o más rondas adicionales de autofecundación o cruce, y seleccionar posteriormente, para una planta que comprende el rasgo. Las plantas que tienen el rasgo en la F2 son plantas adecuadas que producen lotes de semillas F3 en los que aproximadamente el 100% de las semillas F3 ensayadas en la oscuridad a temperaturas de al menos 31,8°C, germinan.

25 Un método para introducir otro rasgo deseado en una planta *Lactuca sativa* L, planta que lleva una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, que como se describió aquí comprende:

- 30 a) cruzar una planta de *Lactuca sativa* L que lleva una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, semillas representativas de las cuales se depositaron bajo el número de depósito NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926, con una segunda planta de *Lactuca sativa* L. que comprende otro rasgo deseado para producir la progenie de F1;
- b) seleccionar la progenie de F1 que comprende dicha mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado para germinar a alta temperatura y el otro rasgo deseado;
- 35 c) cruzar la progenie F1 seleccionada con cualquiera de las madres, para producir la progenie de retrocruzamiento;
- d) seleccionar la progenie de retrocruzamiento que comprende el otro rasgo deseado y la mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado para germinar a alta temperatura; y
- 40 e) repetir opcionalmente las etapas c) y d) una o más veces seguidas para producir una cuarta o más alta progenie de retrocruzamiento seleccionada que comprende el otro rasgo deseado y la mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado para germinar a alta temperatura. Una planta *Lactuca sativa* L. de la invención se puede producir por este método.

45 La selección para el rasgo de la invención se inicia en la F2 de un cruce o alternativamente de un retrocruzamiento. La selección de plantas en la F2 se puede hacer fenotípicamente así como utilizando un marcador(es) molecular(es) que detecte directa o indirectamente la mutación subyacente al rasgo.

La selección de plantas que tienen la mutación, que cuando se presentan homocigóticamente proporcionan la semilla en un estado no acondicionado para germinar a alta temperatura, pueden iniciar en la F3 o en una generación posterior.

50 La planta que comprende la mutación es una planta de una línea endogámica, un híbrido, un haploide duplicado, o de una población segregante.

También se describe aquí un método para la producción de una planta de *Lactuca sativa* L. que tiene la mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, utilizando una técnica de generación de haploide duplicado para generar una línea de haploides duplicados que comprende dicho rasgo.

- 5 Además se describen aquí las semillas híbridas que pueden cultivarse en una planta que tiene la mutación, que cuando se presentan homocigóticamente proporcionan la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y un método para producir tales semillas híbridas que comprende cruzar una primera planta madre con una segunda planta madre y cosechar la semilla híbrida resultante, en donde dicha primera planta madre y/o dicha segunda planta madre es una planta como la reivindicada, es decir, una planta que
10 tiene el rasgo de germinación a alta temperatura como se definió aquí. Cuando ambas madres tienen el rasgo de la invención difieren adecuadamente en uno o más, preferiblemente múltiples, otros rasgos.

- 15 También se describe aquí un método para producir una planta de *Lactuca sativa* L. híbrida que tiene la mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, que comprende cruzar una primera planta de *Lactuca sativa* L. madre con una segunda planta de *Lactuca sativa* L. madre y cosechar la semilla híbrida resultante, de la que la primera planta madre y/o la segunda planta madre tiene la mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y cultivar dichas semillas híbridas en plantas híbridas que tienen la mutación, que cuando se presentan homocigóticamente proporcionan la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura.

- 20 También se describe un método para la producción de una planta de *Lactuca sativa* L. que tiene la mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, utilizando una semilla que comprende la mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, para el crecimiento de dicha planta de *Lactuca sativa* L. Las semillas son semillas adecuadas de las
25 que una muestra representativa se depositó con el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

- 30 Un método para la producción de semillas que comprende el cultivo de las plantas de *Lactuca sativa* L. a partir de semillas de las que una muestra representativa se depositó con el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926, permitiendo que las plantas produzcan semillas, y cosechando esas semillas. También se describe la producción de las semillas que se realiza adecuadamente mediante cruzamiento o autofecundación. Preferiblemente, las semillas así producidas tienen la capacidad para germinar a elevada temperatura.

- 35 Un método para la producción de una planta de *Lactuca sativa* L. que tiene la mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, que puede comprender el utilizar un cultivo tisular.

Además se describe el método para la producción de una planta de *Lactuca sativa* L. que tiene la mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, utilizando reproducción vegetativa.

- 40 Un método para la producción de una planta de *Lactuca sativa* L. que tiene la mutación, que cuando está presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, puede comprender utilizar un método para la modificación genética para introgresar dicho rasgo en la planta de *Lactuca sativa* L. La modificación genética comprende la modificación transgénica o transgénesis, utilizando un gen de especies no cruzables o un gen sintético, y la modificación cisgénica o cisgénesis, utilizando un gen natural, que codifica un rasgo (agrícola), de la propia planta de cultivo o de una planta donante sexualmente
45 compatible.

- También se describe un método de reproducción para el desarrollo de las plantas de *Lactuca sativa* L. que tienen la mutación, que cuando se presentan homocigóticamente proporcionan la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura en donde se utiliza el germoplasma que comprende dicha mutación o rasgo. Semillas representativas de dichas plantas que comprenden la mutación y que son representativas del
50 germoplasma se depositaron con el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

- 55 Además se describe un método para la producción de una planta de *Lactuca sativa* L. que tiene la mutación, que cuando se presentan homocigóticamente proporcionan la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, en donde la progenie o el material de propagación de una planta que comprende la mutación que confiere dicho rasgo se utiliza como fuente para introgresar dicho rasgo en otra planta de *Lactuca sativa* L. Semillas representativas de dicha planta que comprenden la mutación se depositaron con el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

La invención proporciona preferiblemente una planta de *Lactuca sativa* L. que tiene la mutación, que cuando están presente homocigóticamente proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, dicha planta puede obtenerse por cualquiera de los métodos descritos aquí y/o familiar para la persona experta.

5 También se describe un método para seleccionar una planta de lechuga que tiene una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, dicho método comprende cribar las semillas que dan lugar a dicha planta para el rasgo mencionado anteriormente como se describe aquí. El cribado puede comprender por ejemplo ensayar semillas
10 o plantas para detectar la presencia de dicha mutación y/o cribar los lotes de semillas para su capacidad de germinación a alta temperatura.

Se describe aquí el uso de una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, para producir una planta de lechuga que comprende dicha mutación en su genoma, dicha mutación está presente en el genoma de las plantas de las que una muestra representativa se depositó con el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41915,
15 NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

De acuerdo con otro aspecto de la misma, la invención se refiere a una planta de lechuga no natural que comprende una mutación en su genoma, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, dicha mutación está presente en el genoma de las plantas de las que una muestra representativa se depositó con el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923
20 y NCIMB 41926.

También se describe un método para obtener una planta de lechuga de la especie *Lactuca sativa* L. que lleva una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, que comprende:

- 25 a) tratar semillas M0 de una planta de lechuga a modificar con un agente mutagénico para obtener semillas M1;
b) cultivar plantas a partir de las semillas M1 así obtenidas para obtener plantas M1;
c) producir semillas M2 por autofecundación de plantas M1; y
d) repetir opcionalmente las etapas b) y c) n veces para obtener semillas M1+n.

Las semillas M1+n así obtenidas se germinan a alta temperatura. Posteriormente, cualquier semilla que germine se cultiva en las plantas. Para la confirmación, estas plantas se autofertilan después para producir semillas de progenies adicionales, que se germinan preferiblemente a alta temperatura de germinación y bajo condiciones de oscuridad continua (24h/día). Las semillas confirmadas se cultivan en plantas, y éstas se multiplican opcionalmente una o más generaciones adicionales mientras continúan seleccionando la capacidad para germinar a alta temperatura.

35 Un ejemplo de mutágeno bien conocido es el Metano Sulfonato de Etilo (EMS). EMS alquila principalmente los restos G de una cadena de DNA que durante la replicación del DNA causa emparejamiento con la T en vez de con la C. Por lo tanto, los pares de bases GC cambian a pares de bases AT a una frecuencia que se determina por la dosis efectiva de EMS y la actividad del sistema de reparación del desajuste de la planta. La dosis efectiva de EMS depende de la concentración utilizada, el tamaño de la semilla y otras propiedades físicas y el tiempo de incubación
40 de las semillas en la solución de EMS. Las semillas que se han tratado con EMS se llaman generalmente 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 germinal (células germinales) se transferirán a la siguiente generación que se llama M2. Debe observarse que aunque la mayoría de las mutaciones inducidas por EMS y el rasgo resultante son recesivos monogénicos, existe la posibilidad
45 de que ocurran mutaciones dominantes monogénicas que conducen a un rasgo dominante monogénico. Además, las mutaciones o combinaciones de las mismas que son haplo-insuficientes que causan así la esterilidad o que inducen letalidad embrionaria no se transferirán a la generación M2.

Un procedimiento similar al descrito anteriormente para el uso de EMS se aplica también para otros agentes mutagénicos. Otros agentes mutagénicos incluyen pero no se limitan a, sulfato de dietilo (des), etilenimina (ei), propano sulfona, N-metil-N-nitrosouretano (mnu), N-nitroso-N-metilurea (NMU), N-etil-N-nitrosourea (enu), y azida de sodio.

Alternativamente, las mutaciones se inducen por medio de irradiación, que se selecciona por ejemplo de rayos X, neutrones rápidos, radiación UV.

Las mutaciones se pueden inducir también 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, regulación posterior a través de la interferencia de RNA, etc.

5 La tecnología que permite la modificación de dianas génicas en el genoma de una planta de una manera específica es conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se ha demostrado que los oligonucleótidos quiméricos son mutágenos efectivos con un modo específico de acción. Otro enfoque es modificar las dianas génicas a través de la recombinación homóloga o gene targeting “apuntar a un gen”. Utilizando dicho enfoque, se intercambia un fragmento de un gen por un fragmento de DNA introducido que contiene una modificación deseada. Son también viables los enfoques transgénicos en los que los genes diana modificados se introducen para que compitan con el producto endógeno. Esto puede conducir a efectos negativos dominantes. Además, la regulación posterior específica de la expresión de los genes es factible a través de la interferencia del RNA.

Material depositado

15 Las semillas de las plantas de *Lactuca sativa* que muestran una capacidad de germinación mejorada a altas temperaturas se depositaron bajo los números de registro de depósito NCIMB 41915, 41916, 41917, 41918, 41919, 41922, 41923, y 41926 el 4 de Enero de 2012 con NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA). Todas las semillas de los depósitos comprenden la mutación homocigota.

Se debe observar que las semillas depositadas son el resultado de un tratamiento de mutagénesis y no cumplen los criterios DUS que se requieren para obtener la protección de las variedades de plantas, y por lo tanto, no pueden considerarse variedades de plantas.

20 **Datos de secuencia**

Tabla 1

Datos de secuencia de los marcadores SNP

25 En los depósitos NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, y NCIMB 41926, la mutación que proporciona las semillas en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, se localiza en el grupo de vinculación 3, entre los marcadores HTG-1 (SEQ ID NO: 1) y HTG-2 (SEQ ID NO: 2). En NCIMB 41923 la mutación se localiza entre los marcadores HTG-3 (SEQ ID NO: 3) y HTG-4 (SEQ ID NO: 4). Las diferencias en la secuencia de nucleótidos entre los alelos para cada marcador en los diferentes antecedentes de tipo nativo se indican entre paréntesis cuadrados [], de modo que SEQ ID NO: 1 y 2 es [Sensaï, o Troubadour, o Yorvik/Apache] y SEQ ID NO: 3 y 4 es [Sensaï/Apache].

HTG-1 SEQ ID NO: 1	TTGAATATTATAACAATGCTACTTTCTCCGCTCGTCGGCCG[C/T]AGAAG ACGGCAATGAAATTTCCAGTATTACCATTTCGTTGTTTTGCATGT
HTG-2 SEQ ID NO: 2	CAATTAGCACAACAACCTTATCGACCATAGGGAAATCCATG[G/C]MACT GTGGCGGCCACCCCGAGTAAGCGAAAGGGMGAAACAAMA
HTG-3 SEQ ID NO: 3	ATATGTCAGCACAAGGCTATACCGGGTCTATTTGACTCCC[G/A]GATC TATTCACCCACATATATGAAGTAAACAAGCACACATGGATATA
HTG-4 SEQ ID NO: 4	CCATGTTTCRCTAGATTTGAATCAAGGAAATCCCAGTTTAATGAATCAA AG[A/G]CTTTATCAAAATCAACTTTGAAGAGAATGATCTTCTTTT

30

Figuras

La presente invención se aclarará adicionalmente en los ejemplos que siguen. Estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de esta invención de ninguna manera. Los ejemplos hacen referencia a las siguientes figuras:

35 **Figura 1A:** El gráfico que muestra los porcentajes de germinación final en un intervalo de temperatura dado, para lotes de semillas de tipo nativo de Apache, Sensaï, Troubadour, y Torvik. La GT50 Dark es la temperatura a la que el porcentaje de germinación final se espera que sea del 50%.

40 **Figura 1B:** El gráfico que muestra los porcentajes de germinación final en un intervalo de temperatura dado, para lotes de semillas mutantes. La GT50 Dark es la temperatura a la que el porcentaje de germinación final se espera que sea del 50%.

Figura 1C: El gráfico que muestra los porcentajes de germinación final en un intervalo de temperatura dado, tanto para los lotes de semillas de tipo nativo como los mutantes juntos. La GT50 Dark es la temperatura a la que el porcentaje de germinación final se espera que sea del 50%.

Ejemplos

5 Ejemplo 1

Modificación genética de semillas de lechuga Apache, Sensai, Troubadour, y Yorvik por Metano Sulfonato de Etilo (EMS).

10 Las semillas de las variedades de lechuga de tipo nativo Apache, Sensai, Troubadour, y Yorvik (las cuatro de Rijk Zwaan, De Lier, The Netherlands) se trataron con EMS mediante el sumergimiento de aproximadamente 2.000 semillas por variedad en una solución aireada de 0,5% (peso/volumen) o 0,7% de EMS durante 24 horas a temperatura ambiente.

Aproximadamente se germinaron 1.500 semillas tratadas por variedad por dosis de EMS y las plantas resultantes se cultivaron en un invernadero en Los Países Bajos (por ejemplo, 52° de Latitud, clima Oceánico, clasificación climática de Köppen Cfb) desde Mayo a Septiembre para producir semillas.

15 Después de la maduración, las semillas M2 se cosecharon y se agruparon en un grupo por variedad por tratamiento. Los ocho grupos resultantes de semillas M2 se utilizaron como material de partida para identificar las semillas M2 individuales que contienen alelos de germinación a alta temperatura.

20 La eficacia del procedimiento de modificación genética se evaluó determinando la presencia de plantas blanqueadas, lo que es indicativo de la pérdida de clorofila debido a la modificación en los genes involucrados directa o indirectamente en la formación o acumulación de clorofila. Se observó que las plantas individuales dentro de cada uno de los 8 grupos de semillas M2 se decoloraron. Esto demuestra que los tratamientos aplicados dieron como resultado modificaciones genéticas.

Ejemplo 2

Identificación de semillas de lechuga Apache, Sensai, Troubadour, y Yorvik capaces de germinar a alta temperatura.

25 Las semillas de lechuga capaces de germinar a alta temperatura se identificaron entre las semillas M2 que se produjeron como resultado del tratamiento con EMS descrito en el Ejemplo 1.

30 De cada una de los 8 grupos de M2 disponibles, se germinaron aproximadamente 2.000 semillas en papel de filtro humedecido en un recipiente cerrado. Las semillas M2 de Apache, Yorvik y Troubadour se incubaron a 34°C, mientras que las semillas M2 de Sensai se incubaron a 32°C, bajo condiciones de oscuridad continua (24h/día) para imitar las condiciones de germinación naturales debajo del suelo o cuando las semillas están encapsuladas en gránulos.

Cualquier semilla que germinó a las temperaturas dadas se sembró en plantas. Estas plantas se autofecundaron para producir semillas M3. Las semillas M3 se germinaron otra vez a 34°C bajo condiciones de oscuridad continua, para confirmar la presencia de alelos que germinan a alta temperatura.

35 Las semillas M3 confirmadas se cultivaron en líneas M3 que se multiplican después, de las que semillas representativas se depositaron con el NCIMB bajo los números de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, NCIMB 41923 y NCIMB 41926.

Ejemplo 3A

40 Ensayo de germinación de las semillas Apache, Sensai, Troubadour, y Yorvik de tipo nativo y semillas de lechuga mutantes

Los ensayos de germinación se llevaron a cabo a diferentes temperaturas, para determinar la germinación acumulativa en el tiempo a una temperatura dada para cada lote de semillas de tipo nativo de las variedades de lechuga Apache, Sensai, Troubadour, y Yorvik, así como las semillas del depósito tratadas con EMS (obtenidas en el Ejemplo 2).

45 Para cada lote de semillas, se sembraron 100 semillas sobre el papel de filtro redondo, que se humedeció con agua del grifo. Las semillas sembradas sobre el papel de filtro redondo se colocaron dentro de una bandeja de plástico no transparente, que a su vez estaba revestida con una gran pieza cuadrada de papel de filtro de remolacha humedecido con agua del grifo. Además, se colocó un dispositivo de registro de temperatura en el papel de filtro de remolacha para registrar la temperatura de germinación real a nivel de la semilla. La bandeja se cerró después con una tapa no transparente bien ajustada, y se envolvió dentro de una capa de plástico oscura. Las bandejas se colocaron dentro de una incubadora precalentada a la temperatura deseada. Los ensayos de germinación se

50

realizaron de 18°C a 42°C. Las réplicas biológicas se sembraron en diferentes bandejas y preferiblemente a diferentes puntos de tiempo para eliminar cualquier sesgo relacionado con la siembra.

5 Se tomaron todas las precauciones para asegurar que los ensayos de germinación se realizaran bajo condiciones de oscuridad. La configuración de los ensayos de germinación, las incubaciones y las valoraciones de la germinación se realizaron todas dentro de una habitación termoestable, aislada de todas las fuentes de luz externa. Para prevenir cualquier efecto de la luz en la germinación, la habitación se iluminó con luces verdes seguras (Philips TL-D 36W/17 Green).

10 La germinación se valoró dos veces al día. Una semilla se calificó como germinada cuando se pudo observar una proliferación de radicales visibles a través del pericarpio de la semilla. Las curvas “germinación con el tiempo” se trazaron para mostrar la germinación acumulativa de un lote de semillas dado en el tiempo, a la temperatura establecida. Entre otros parámetros, el porcentaje de germinación final para un lote de semillas dado a una temperatura dada, se podía determinar también a partir de la curva “germinación con el tiempo”.

Ejemplo 3B

15 Determinación de la GT50 Dark de los lotes de semillas Apache, Sensai, Troubadour, y Yorvik de tipo nativo y lotes de semillas mutantes

Para determinar la GT50 Dark de un lote de semillas dado, el porcentaje de germinación final de cada curva “germinación con el tiempo” del Ejemplo 3A, se trazó para la temperatura medida real, de 18°C a 42°C (Figura 1A, 1B, y 1C). Se utilizó una línea de mejor ajuste para ajustar los porcentajes de germinación final en una curva.

20 La GT50 Dark se obtuvo por lote de semillas, para determinar la temperatura a la que el porcentaje de germinación final se espera que sea del 50% (Tabla 2). Cuando las semillas de un lote de semillas dado se exponen a temperaturas superiores a la GT50 Dark, pueden convertirse en termolábiles o morir.

25 Está claro a partir de las figuras 1A, 1B, y 1C y la Tabla 2 (aumento relativo en la GT50 Dark entre los lotes de semillas mutantes y los lotes de semillas de tipo nativo) que la GT50 Dark de los lotes de semillas que comprenden semillas no acondicionadas de la invención que llevan una mutación en el estado homocigoto, es significativamente mayor que los lotes de semillas que comprenden semillas no acondicionadas que no llevan dicha mutación. Esto demuestra que la capacidad de una semilla de la invención de germinar a alta temperatura resulta directamente de dicha mutación.

Tabla 2 GT50 Dark de lotes de semillas mutantes y lotes de semillas de tipo nativo. A=Apache; S=Sensai; T=Troubadour; Y=Yorvik

Nombre o número de la semilla	Origen	GT50 Dark (°C)	Aumento relativo en la GT50 Dark entre los lotes de semillas mutantes y los lotes de semillas de tipo nativo (°C)
Apache	-	28,7	-
Sensai	-	28,1	-
Troubadour	-	29,0	-
Yorvik	-	20,0	-
NCIMB 41919	Y	35,6	15,6
NCIMB 41922	Y	33,3	13,3
NCIMB 41923	S	39,2	11,1
NCIMB 41915	T	38,0	9,0
NCIMB 41916	T	38,3	9,3
NCIMB 41917	T	39,3	10,3
NCIMB 41926	A	40,1	11,4
NCIMB 41918	A	36,6	7,9

30 Ejemplo 4

Transferencia del rasgo de la invención a otras plantas de lechuga

Una planta de lechuga de la invención se cruzó con una planta de lechuga de tipo nativo (WT) del tipo de hoja incisa, que no lleva el rasgo de la invención.

ES 2 686 143 T3

La GT50 Dark de las semillas F1 resultantes se determinó como se describió en los Ejemplos 3A y 3B. Las semillas F1 tuvieron la misma GT50 Dark que las semillas de las plantas WT (por ejemplo, las semillas no fueron capaces de germinar a alta temperatura).

- 5 De la población de F1 que se cultivó a partir de semillas F1, se seleccionó una planta que se autofecundó para obtener una población de plantas F2. Las plantas F2 se fecundaron otra vez para producir lotes de semillas F3. Estos lotes de semillas F3 se germinaron después en la oscuridad a temperaturas de al menos 31,8°C. En aproximadamente un cuarto de los lotes de semillas F3, de las semillas ensayadas no germinaron las semillas. En aproximadamente otro cuarto de los lotes de semillas F3, casi el 100% de las semillas ensayadas germinaron, lo que indicó que la mutación estaba presente en la planta madre F2 correspondiente en un estado homocigoto.
- 10 En aproximadamente la mitad de los lotes de semillas F3, aproximadamente el 25% de las semillas ensayadas germinaron, lo que indica que la mutación estaba presente en la planta madre F2 correspondiente en estado homocigoto. La segregación de los lotes de semilla F3 corresponde a una herencia recesiva monogénica del rasgo de la invención. Una planta F3 se cultivó después a partir de un lote de semillas F3 que tenían la mutación homocigóticamente presente en la planta madre F2 correspondiente. Esta planta F3 se utilizó para el cruce adicional
- 15 para transferir el rasgo de la invención a otras plantas de lechuga.

REIVINDICACIONES

1. Un lote de semillas de la especie *Lactuca sativa* L. en donde las semillas que pertenecen al lote de semillas comprenden una mutación, que cuando se presentan homocigóticamente, proporcionan las semillas en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, y que el lote de semillas se caracteriza en que la GT50 Dark de dicho lote de semillas es al menos 6,2°C mayor que la GT50 Dark de un lote de semillas de las semillas que no comprenden la mutación, y en donde dicha mutación está presente en semillas de las que una muestra representativa se ha depositado bajo el número de registro NCIMB 41915, NCIMB 41916, NCIMB 41917, NCIMB 41918, NCIMB 41919, NCIMB 41922, y NCIMB 41926 y se localiza en el grupo de vinculación 3, entre los marcadores HTG-1 (SEQ ID NO: 1) y HTG-2 (SEQ ID NO: 2) o está presente en semillas de las que una muestra representativa se depositó bajo el número de registro NCIMB 41923 y se localiza en el grupo de vinculación 3, entre los marcadores HTG-3 (SEQ ID NO: 3) y HTG-4 (SEQ ID NO: 4), y en donde las semillas que pertenecen al lote de semillas no se obtienen exclusivamente por un proceso esencialmente biológico.
2. El lote de semillas como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la GT50 Dark del lote de semillas es al menos 31,8°C.
3. El lote de semillas como se reivindica en las reivindicaciones 1 y 2, en donde la GT50 Dark del lote de semillas en orden de mayor preferencia se encuentra entre 31,8°C y 42°C, entre 32°C y 42°C, entre 33°C y 42°C, entre 34°C y 42°C, entre 35°C y 42°C, entre 36°C y 42°C, entre 37°C y 42°C, entre 38°C y 42°C, entre 39°C y 42°C, entre 40°C y 42°C, entre 41°C y 42°C.
4. Una semilla que pertenece a un lote de semillas como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Una planta de lechuga de la especie *Lactuca sativa* L. que lleva una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y en donde la planta no se obtiene exclusivamente por un proceso esencialmente biológico.
6. Una progenie de una planta de lechuga como se reivindicó en la reivindicación 5, que lleva una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
7. Un material de propagación derivado de una planta como se reivindicó en la reivindicación 5, que lleva una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
8. Un material de propagación capaz de crecer en una planta como se reivindicó en la reivindicación 5, que lleva una mutación, que cuando está presente homocigóticamente en una semilla, proporciona la semilla en un estado no acondicionado con la capacidad para germinar a alta temperatura, como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
9. Un material de propagación como se reivindicó en las reivindicaciones 7 o 8, en donde el material de propagación se selecciona del grupo que consiste en microesporas, polen, ovarios, óvulos, embriones, sacos embrionarios, ovarios, esquejes, raíces, puntas de las raíces, hipocótilos, cotiledones, tallos, hojas, flores, anteras, semillas, células meristemáticas, protoplastos, y células.
10. Un cultivo tisular de un material de propagación como se reivindicó en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.

Fig. 1A

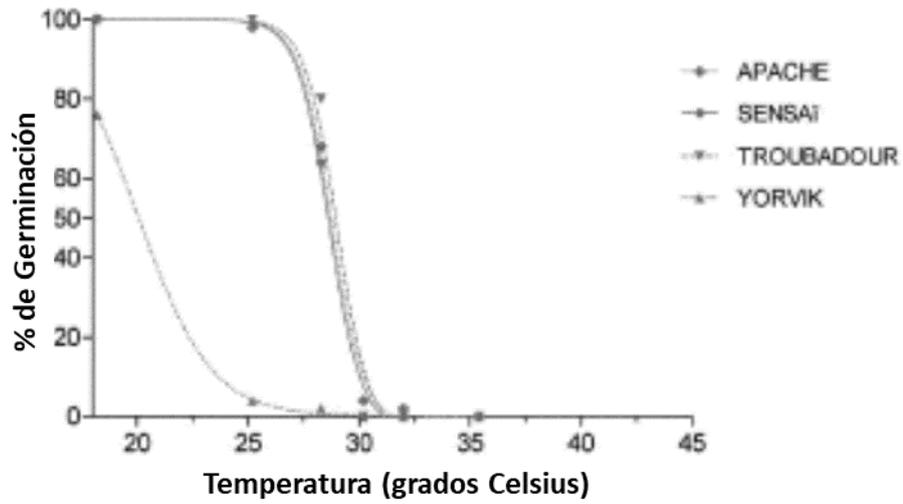


Fig. 1B

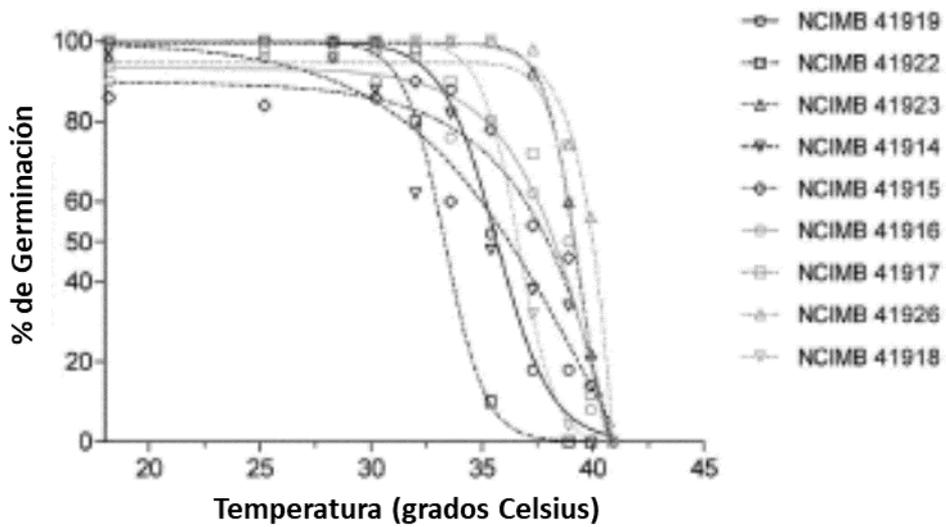


Fig. 1C

