

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 989**

51 Int. Cl.:

A01H 5/12 (2008.01)

A01G 2/00 (2008.01)

A01H 5/00 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2014 PCT/JP2014/062059**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14178420**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2014 E 14791132 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2992756**

54 Título: **Cebolla con pungencia reducida que no genera componente lacrimógeno**

30 Prioridad:

01.05.2013 JP 2013096551

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

13.02.2019

73 Titular/es:

**HOUSE FOODS GROUP INC. (100.0%)
5-7, Mikuriyasakae-machi 1-chome
Higashiosaka-shi, Osaka 577-8520, JP**

72 Inventor/es:

**KATO MASAHIRO;
SHONO JINJI;
MASAMURA NORIYA;
IMAI SHINSUKE y
KAMATA YASUHIRO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 699 989 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

Cebolla con pungencia reducida que no genera componente lacrimógeno

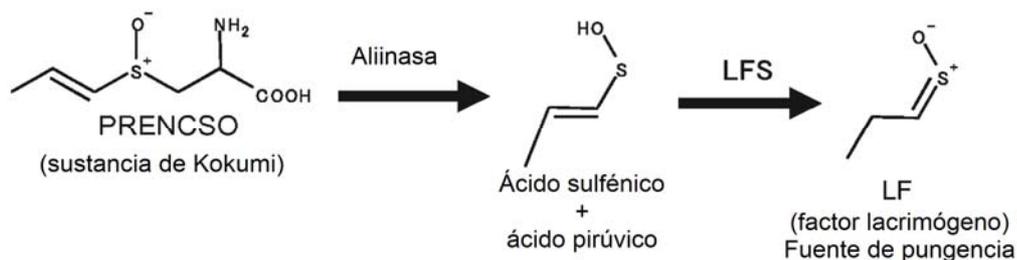
5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una cebolla que presenta una propiedad de pungencia y que induce el lagrimeo muy débil o nula y a un método para producir dicha cebolla.

10 Antecedentes

En los últimos años, las tendencias hacia la provisión de verduras que los niños pueden comer fácilmente o la ingesta de verduras crudas por parte de consumidores conscientes de la salud se han vuelto populares, y se ha hecho un intento de mejora de las variedades vegetales para satisfacer dichas necesidades. Sin embargo, las verduras, como las plantas del género *Allium*, en particular las cebollas, son difíciles de comer crudas debido a su pungencia distintiva.

Se encuentra que el factor lacrimógeno (FL) que actúa como componente pungente y también como componente lacrimógeno de la cebolla se genera mediante el mecanismo de reacción que se muestra a continuación, que se produce al cortar o romper el tejido de la cebolla cruda (Imai S. et al. An onion enzyme that makes the eyes water, *Nature*, 419, 685, 2002).



25 Cuando la célula de cebolla se rompe durante la cocción o el procesamiento, específicamente, se degrada sulfóxido de trans-1-propenil cisteína (PRENCSO) como sustrato por la aliinasa, y se generan ácido sulfénico (ácido 1-propenilsulfénico), ácido pirúvico y amoníaco en una cantidad de una molécula cada una a partir de una molécula de PRENCSO. El ácido sulfénico generado se convierte entonces en el factor lacrimógeno (FL, propanetial-S-óxido) como componente pungente por el factor lacrimógeno sintasa (FLS).

30 En Japón, hay una variedad de maduración muy temprana de una cebolla con poca pungencia, que se conoce como "cebolla de primavera". En una variedad de cebolla de maduración muy temprana, el contenido de humedad es alto y la cantidad de materia seca es baja. La concentración de PRENCSO es reducida y la cantidad de un componente pungente (factor lacrimógeno) generado es reducida debido a las características descritas anteriormente. Aunque la pungencia de una variedad de cebolla de maduración muy temprana es baja, produce algo de pungencia. En consecuencia, es necesario sumergir la cebolla en agua cuando se debe comer cruda. Además del trabajo requerido para la inmersión de la cebolla en agua, los componentes nutritivos se perderían debido a la inmersión. Además, la estabilidad de almacenamiento de la variedad indicada anteriormente es deficiente y, de manera desventajosa, dicha variedad se puede proporcionar solo un tiempo limitado.

40 Como técnica de producción de una variedad con baja pungencia, se ha empleado una técnica de regulación de la fertilización para reducir la cantidad de un sustrato que sirve como origen de la pungencia. Sin embargo, dicho sustrato no se elimina completamente con la técnica y, en general, la pungencia no se reduce hasta el punto de que la pungencia no se detecte cuando se come la cebolla cruda.

45 Además, hasta ahora se han desarrollado y reportado cebollas con pungencia reducida. La patente JP 2009-501528 A describe que las cebollas de día largo que tienen una baja pungencia y la cantidad de ácido pirúvico generado cuando se rompen los tejidos de la cebolla es de 3,0 a 5,5 $\mu\text{mol/g}$ FW. La patente JP 2011-510618 A también describe cebollas de día largo que tienen una baja pungencia y la cantidad de ácido pirúvico generado cuando se rompen los tejidos de la cebolla es de 2,5 a 5,5 $\mu\text{mol/g}$ FW. Mientras que las variedades de cebolla descritas en el presente documento muestran una baja pungencia, dichas cebollas no están completamente libres de esta

50 pungencia. Por consiguiente, es necesario sumergir dichas cebollas en agua cuando se vayan a comer crudas.

Por consiguiente, en la técnica todavía se desean cebollas con una propiedad de pungencia y que induzca el lagrimeo muy débil o nula.

55

Sumario de la invención

Objetos que pretende alcanzar la invención

- 5 Es un objeto de la presente invención proporcionar una cebolla con una propiedad de pungencia y que induzca el lagrimeo muy débil o nula y un método para producir dicha cebolla.

Medios para alcanzar los objetos

- 10 Los presentes inventores han realizado estudios concentrados con el fin de alcanzar los objetivos anteriores. Como resultado, descubrieron que la expresión del gen de la aliinasa puede reducirse en las células de cebolla, a fin de producir cebollas con una propiedad de pungencia y que induzca el lagrimeo muy débil o nula. Esto ha dado lugar a la finalización de la presente invención.

- 15 Específicamente, la presente invención tiene las siguientes características, de acuerdo con lo definido por el objeto de las reivindicaciones independientes y dependientes.

Por lo tanto, la presente invención proporciona:

- Una planta de cebolla o una progenie o una de sus partes en la que la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente y el gen de la aliinasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (a) o (b):

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5; o
(b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 % o superior a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa, en donde la planta de cebolla no se obtiene exclusivamente por un proceso esencialmente biológico.

- Un método para producir una planta de cebolla o una de sus partes en donde la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente, el método que comprende las siguientes etapas:

- (i) inducir mutagénesis en una semilla de cebolla por haces de iones pesados;
(ii) cultivar la semilla de cebolla mutagenizada para obtener una planta de cebolla o una de sus partes; y
(iii) seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes que muestre los rasgos descritos a continuación de la planta de cebolla obtenida o una de sus partes:

- la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente y el gen de la aliinasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (a) o (b):

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5; o
(b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 % o superior con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa.

- Un método para evaluar la pungencia de una planta de cebolla o una de sus partes, que comprende analizar el nivel de expresión del gen de la aliinasa en la planta de la cebolla o una de sus partes, en donde el gen de la aliinasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (a) o (b):

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5; o
(b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 % o superior a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa, y si la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente, se evalúa como que disminuye la pungencia de la planta de cebolla o una de sus partes.

- Un método para seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes en donde las cantidades de un componente pungente y un componente lacrimógeno producidos disminuyen en comparación con el caso de una variedad existente,

- el método comprende analizar el nivel de expresión del gen de la aliinasa en una planta de cebolla o parte de la misma y seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes en donde la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente, en donde el gen de la aliinasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (a) o (b):

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5; o
(b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 % o superior con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa.

65

La presente descripción describe:

[1] Una planta de cebolla o una progenie o una de sus partes en la que la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente.

[2] La planta de cebolla o la progenie o una de sus partes de acuerdo con [1], en donde las cantidades de un componente pungente y un componente lacrimógeno producidos cuando una célula de cebolla se rompe disminuyen en comparación con el caso de una variedad existente.

[3] La planta de cebolla o la progenie o una de sus partes de acuerdo con [1] o [2], en donde el gen de la aliinasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los siguientes polipéptidos (a) a (c):

(a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5;

(b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o una pluralidad de eliminación, sustitución, inserción y/o adición de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa; y

(c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 90 % o superior con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa.

[4] Un método para producir una planta de cebolla o una de sus partes en donde la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente, el método que comprende las siguientes etapas:

(i) inducir mutagénesis en una semilla de cebolla;

(ii) cultivar la semilla de cebolla mutagenizada para obtener una planta de cebolla o una de sus partes; y

(iii) seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes que muestre uno o más rasgos descritos a continuación de la planta de cebolla obtenida o una de sus partes:

a) las cantidades de un componente pungente y un componente lacrimógeno producidos cuando se rompe una célula de cebolla disminuyen en comparación con el caso de una variedad existente;

b) la expresión del gen o proteína de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente;

c) la cantidad de ácido pirúvico producido cuando se rompe una célula de cebolla disminuye en comparación con el caso de una variedad existente;

d) la cantidad de PRENCSO restante después de que se rompa una célula de cebolla aumenta en comparación con el caso de una variedad existente; y

e) la cantidad de un factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompe una célula de cebolla disminuye en comparación con el caso de una variedad existente.

[5] El método de acuerdo con [4], en donde la etapa (iii) comprende seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes que muestre al menos el rasgo (b).

[6] El método de acuerdo con [4], que además comprende una etapa (iv) de permitir que la planta de cebolla seleccionada se auto-fertilice y someter la planta de cebolla obtenida o una de sus partes a la etapa (iii), que se realiza una vez o una pluralidad de veces.

[7] La planta de cebolla o la progenie o una de sus partes de acuerdo con [1], en donde la parte de la planta de cebolla es una semilla depositada internacionalmente bajo NCIMB 42219.

[8] La planta de cebolla o la progenie o una de sus partes de acuerdo con [1], en donde la parte de la planta de cebolla es un callo depositado internacionalmente bajo FERM BP-22260.

[9] Una planta de cebolla o una de sus partes en donde la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente, que se produce mediante un método que comprende las siguientes etapas:

(i) inducir mutagénesis en una semilla de cebolla;

(ii) cultivar la semilla de cebolla mutagenizada para obtener una planta de cebolla o una de sus partes; y

(iii) seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes que muestre uno o más rasgos descritos a continuación de la planta de cebolla obtenida o una de sus partes:

a) las cantidades de un componente pungente y un componente lacrimógeno producidos cuando se rompe una célula de cebolla disminuyen en comparación con el caso de una variedad existente;

b) la expresión del gen o proteína de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente;

c) la cantidad de ácido pirúvico producido cuando se rompe una célula de cebolla disminuye en comparación con el caso de una variedad existente;

d) la cantidad de PRENCSO restante después de que se rompa una célula de cebolla aumenta en comparación con el caso de una variedad existente; y

e) la cantidad de un factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompe una célula de cebolla disminuye en comparación con el caso de una variedad existente.

[10] La planta de cebolla o una de sus partes de acuerdo con [9], en donde la etapa (iii) comprende seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes que exhiba al menos el rasgo (b).

[11] La planta de cebolla o una de sus partes de acuerdo con [9], en donde el método comprende además una etapa (iv) de permitir que la planta de cebolla seleccionada se someta a la auto-fertilización y someter la planta de cebolla obtenida a la etapa (iii), que se realiza una vez o una pluralidad de veces.

[12] Un método para producir una planta de cebolla o una de sus partes en donde la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente, el método que comprende cruzar una primera planta de cebolla en la que la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente con una segunda planta de cebolla.

[13] Una planta de cebolla o una de sus partes en donde la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente, que se produce mediante el método que comprende cruzar una primera planta de cebolla en la que la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente con una segunda planta de cebolla.

[14] Una planta de cebolla o una progenie o una de sus partes obtenida de una parte de la planta de cebolla en la que la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente.

[15] La planta de cebolla o la progenie o una de sus partes de acuerdo con [14] obtenida de una semilla o un callo de la planta de cebolla en la que la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente.

[16] La planta de cebolla o la progenie o una de sus partes de acuerdo con [15], en donde la semilla está depositada internacionalmente bajo NCIMB 42219.

[17] La planta de cebolla o una progenie o una de sus partes de acuerdo con [15], en donde el callo está depositada internacionalmente bajo FERM BP-22260.

[18] Un método para evaluar la pungencia de una planta de cebolla o una de sus partes, que comprende analizar el nivel de expresión del gen de la aliinasa en la planta de cebolla o una de sus partes.

[19] Un método para seleccionar una planta de cebolla en donde las cantidades de un componente pungente y un componente lacrimógeno producidos disminuyen en comparación con el caso de una variedad existente o una de sus partes,

el método que comprende analizar el nivel de expresión del gen de la aliinasa en una planta de cebolla o una de sus partes y seleccionar la planta de cebolla o una de sus partes en donde la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente.

Esta descripción incluye parte o todo el contenido como se describe en la descripción y/o los dibujos de la solicitud de patente japonesa n.º 2013-096551, que es un documento de prioridad de la presente solicitud.

Efectos de la invención

La presente invención puede proporcionar una cebolla con una propiedad de pungencia y que induzca el lagrimeo muy débil o nula y un método para producir dicha cebolla.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra esquemáticamente un método para obtener una muestra de análisis de un bulbo de cebolla.

La Figura 2 muestra los resultados de medir la cantidad de ácido pirúvico producido cuando se rompen los tejidos del bulbo de cebolla M4.

La Figura 3 muestra los resultados de la medición de la cantidad de PRENCOSO restante 3 horas después de que se rompan los bulbos de cebolla M4.

La Figura 4 muestra los resultados de la medición de la cantidad de factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompen los tejidos del bulbo de cebolla M4.

La Figura 5 muestra los resultados de la medición del nivel de expresión de la proteína aliinasa del bulbo de cebolla M4.

La Figura 6 muestra los resultados de la medición del nivel de expresión del gen de la aliinasa del bulbo de cebolla M4.

La Figura 7 muestra los resultados de la medición de la cantidad de factor lacrimógeno (FL) producido cuando se añade aliinasa al romper el bulbo de cebolla M4.

La Figura 8 es una fotografía que muestra las plúmulas (es decir, el desarrollo de porciones de hojas que incluyen una placa basal) extirpadas de las partes centrales de los bulbos de cebolla.

La Figura 9 es una fotografía que muestra productos de cultivo obtenidos a través de cultivos de callos en un medio de regeneración. Las flechas indican una estructura de superficie lisa observada en el producto de cultivo.

La Figura 10 es una fotografía que muestra plantas regeneradas a partir de un callo.

La Figura 11 muestra los resultados del análisis de la expresión del gen de la aliinasa y la anotación del bulbo de cebolla de la línea # 6 y un bulbo de cebolla de control.

La Figura 12 muestra una secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la aliinasa que se suprime para expresarse en un bulbo de cebolla de la línea # 6 a un nivel significativo.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

1. La cebolla de la presente invención

5 En la cebolla de la presente invención, la expresión del gen de la aliinasa se reduce.

10 El término "planta de cebolla" utilizado en el presente documento se refiere a una planta de cebolla y una parte de la planta, a menos que se especifique lo contrario. Una "parte de la planta" se refiere a cualquiera de una semilla, bulbo, catáfila, hoja, tallo, brote, flor, antera, polen, u óvulo de una cebolla, y una célula, tejido, protoplasto o callo derivados de los mismos, a menos que se especifique lo contrario. Un ejemplo de una semilla de cebolla es uno depositado internacionalmente bajo el Número de Acceso: NCIMB 42219, y un ejemplo de un callo de cebolla es uno depositado internacionalmente bajo el Número de Acceso: FERM BP-22260. Un bulbo u catáfila de una cebolla a veces se denomina simplemente como una "cebolla" en el presente documento, y estos términos se usan indistintamente.

15 En la presente invención, una "progenie" de una planta de cebolla es una planta de cebolla que tiene un historial de ser producida a partir de la planta de cebolla de la presente invención o una de sus partes por medio de reproducción sexual y/o reproducción asexual. En dicha planta de cebolla, la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de las variedades existentes.

20 La planta de cebolla de la presente invención y su progenie pueden cultivarse de acuerdo con una técnica general relevante para la variedad usada, y dichas plantas pueden propagarse por semillas. Generalmente se sabe que un callo se puede inducir desde una parte de un tejido vegetal. Un callo inducido en dicho procedimiento puede regenerarse fácilmente regulando la composición de un medio de cultivo o condiciones de cultivo. Por lo tanto, una planta regenerada en dicho procedimiento no difiere de una planta cultivada a partir de una semilla en términos de rasgos. Dichas propiedades son aplicables a las cebollas, las plantas pueden regenerarse a partir de los callos preparados desde el punto de crecimiento de un bulbo, los pólenes, los óvulos, las anteras o las plántulas, y las plantas regeneradas en dicho procedimiento o las semillas obtenidas tienen los mismos rasgos que las de las plantas cultivadas a partir de semillas o semillas obtenidas de dichas plantas.

25 El término "célula de cebolla" utilizado en el presente documento se refiere a una célula contenida en una planta de cebolla, y preferiblemente a una célula contenida en un bulbo de cebolla o una catáfila de cebolla.

30 El término "gen de la aliinasa" utilizado en este documento es una designación colectiva para una pluralidad de genes de aliinasa que incluyen uno o más polimorfismos de un solo nucleótido (SNP(s)), a menos que se especifique lo contrario.

35 En la presente invención, el término "gen de la aliinasa" se refiere preferiblemente a un gen de la aliinasa particular que es principalmente influyente en la producción de un componente pungente y un componente lacrimógeno. Dicho gen de la aliinasa particular se identifica mediante las siguientes etapas: (Etapa 1) seleccionar una cebolla en la que la cantidad de un componente pungente y un componente lacrimógeno producido se reduce por una o más técnicas de evaluación y ensayo seleccionadas entre la evaluación funcional, un ensayo de la cantidad de producción de ácido pirúvico, un ensayo de la cantidad de PRENCOS restante y un ensayo de la cantidad de producción de FL descrita a continuación; (Etapa 2) analizar de forma exhaustiva la expresión del gen de la aliinasa en la cebolla seleccionada y en una cebolla de control de la misma variedad, que tiene pungencia, utilizando un secuenciador de próxima generación mediante la técnica descrita en detalle en el Ejemplo 7, para extraer una secuencia genética que muestre una diferencia en el nivel de expresión génica entre la cebolla de prueba y la cebolla de control; y, (Etapa 3) cuando el gen de la aliinasa que se reduce a expresarse en la cebolla seleccionada a un nivel significativo y el que se observa que se expresa en la cebolla de control se encuentra en la secuencia del gen extraído, identificar dicho gen de la aliinasa como el gen de la aliinasa particular. El nivel de expresión del gen de la aliinasa particular en la cebolla seleccionada y la cebolla de control (cebolla seleccionada:cebolla de control) puede ser, por ejemplo, de 1:50 o superior, preferiblemente de 1:100 o superior, y más preferiblemente de 1:1000.

40 Dicho gen de la aliinasa particular comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos (a) a (c):

- 45 (a) un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5;
- 50 (b) un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene uno o una pluralidad de eliminación, sustitución, inserción y/o adición de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa; o
- 55 (c) un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 70 % o superior, 80 % o superior, 90 % o superior, 95 % o superior, 96 % o superior, 97 % o superior, 98 % o superior, o 99 % o superior a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa.

El término "una pluralidad de" utilizado en el presente documento se refiere a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2. Las secuencias de aminoácidos pueden compararse de acuerdo con una técnica convencional, por ejemplo, con el uso de BLAST (Herramienta de búsqueda básica de alineación local en el Centro Nacional de Información Biológica) con ajustes predeterminados. El término "actividad aliinasa" se refiere a la actividad de degradar PRENCOSO y generar ácido sulfénico, ácido pirúvico y amoníaco. La actividad aliinasa se puede analizar de acuerdo con una técnica descrita en detalle en los ejemplos a continuación. Puede analizarse detectando y analizando una sustancia resultante de la degradación de PRENCOSO o una sustancia generada a partir de ella (es decir, el ácido sulfénico se convierte en FL con la ayuda de FLS) a través de HPLC.

Como resultado de la búsqueda por medio de NCBI Protein Blast (con parámetros predeterminados) usando la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 como secuencia de consulta, se encontró que la SEQ ID NO: 5 exhibe una alta homología del 99,8 % (478 a.a./479 a.a.), 99,8 % (478 a.a./479 a.a.), y 98,7 % (473 a.a./479 a.a.) con las secuencias de los Números de Acceso: AAA32639.1, AAA92463.1, y AAD26853.1, respectivamente.

Cuando "la expresión del gen de la aliinasa se reduce en comparación con el caso de una variedad existente" en la presente invención, el nivel de expresión del gen de la aliinasa en una célula de cebolla es significativamente menor que el nivel de expresión del gen de la aliinasa en una célula de una variedad de cebolla existente. Por ejemplo, el nivel de expresión es menos de una quincuagésima parte, menos de una centésima, menos de una dos centésima, menos de una tres centésima, menos de una cuatro centésima, menos de una cinco centésima, menos de una seis centésima, menos de una siete centésima, menos de una ocho centésima, menos de una nueve centésima, menos de una milésima, menos de una dos milésima, menos de una tres milésima, menos de una cuatro milésima, menos de una cinco milésima, menos de una seis milésima, menos de una siete milésima, menos de una ocho milésima, menos de una nueve milésima, o menos de una diez milésima parte o inferior. Dicha expresión génica puede o puede no perderse.

El término "variedad existente" que se usa en este documento se refiere a una variedad general de cebolla que muestra propiedades pungentes y de inducción de lagrimeo cuando las células de cebolla se rompen. Entre sus ejemplos se incluyen cultivares de cebolla sembrados en primavera, tales como Super Kita-momiji, Kita momiji 2000, Kita momiji, Sapporo-ki, Polestar, Tsuki hikari, Kitami-ki, Gekko n.º 22 y Okhotsk y cultivares de cebolla sembrados en otoño, como Osaka maru, Sen-nan Koudaka, Senshu Chu Kouki, Satsuki y Momiji, con Super Kita-momiji, Kita momiji 2000 y Sapporo-ki siendo preferibles. Los ejemplos de variedades existentes incluyen cebollas en las que el nivel de expresión del gen de la aliinasa es de 40 o superior, 50 o superior, 60 o superior, 70 o superior, 90 o superior, o 100 en relación con el nivel de la expresión del gen de la aliinasa en cebollas antes de la mutagénesis, la recombinación de genes o la hibridación (es decir, cepas parentales) y cebollas sembradas en primavera, como Super Kita-momiji, Kita momiji 2000 o Sapporo-ki, designadas como 100. El término "variedad existente" se usa en el presente documento en el mismo sentido que se ha descrito anteriormente.

La expresión del gen de la aliinasa se reduce en la cebolla de la presente invención en comparación con el caso de las variedades existentes. Por lo tanto, el PRENCOSO contenido en las células de cebolla permanece sin ser degradado o transformado por la actividad de la aliinasa cuando las células de cebolla se rompen. Como resultado, las cantidades de ácido pirúvico y ácido sulfénico producidas se reducen, en comparación con sus cantidades producidas cuando se rompen las células de cebolla derivadas de variedades existentes, y se reducen las cantidades de FL, que son un componente pungente y lacrimógeno, producidas cuando la FLS actúa sobre el ácido sulfénico, en comparación con las cantidades producidas cuando se rompen las células de cebolla derivadas de las variedades existentes. En consecuencia, la cebolla de la presente invención exhibe propiedades pungentes y de inducción de lagrimeo muy débiles o nulas cuando las células de la cebolla se rompen en comparación con el caso de las variedades de cebolla existentes. La cantidad de PRENCOSO que queda en la cebolla de la presente invención es preferiblemente de 2,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o superior, más preferiblemente de 3,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o superior, aún más preferiblemente de 4,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o superior, y en particular preferiblemente de 5,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o superior. Además, o alternativamente, la cantidad de ácido pirúvico producido en la cebolla de la presente invención es preferiblemente de 2,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o inferior, más preferiblemente 1,5 $\mu\text{mol/g}$ FW o inferior, aún más preferiblemente 1,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o inferior, y de manera particularmente preferible, 0,5 $\mu\text{mol/g}$ FW o inferior. Además o alternativamente, en la cebolla de la presente invención, en la cebolla de la presente invención, la cantidad de FL producida aproximadamente 1 minuto y 20 segundos después de que se rompan las células de la cebolla es preferiblemente de $1,0 \times 10^6$ área del pico o inferior, más preferiblemente $9,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, $8,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, $7,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, o $6,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, y aún más preferiblemente $5,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, $4,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, $3,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, $2,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, o $1,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, relativa a los μl del extracto.

Dado que la cebolla de la presente invención produce muy poca o ninguna pungencia cuando las células de la cebolla se rompen, en comparación con el caso de las variedades de cebolla existentes, los adultos y los niños que no prefieran la pungencia de la cebolla pueden comer dichas cebollas crudas sin sumergirlas en agua. Debido a que no es necesario sumergir una cebolla en el agua antes de comerla cruda, nutrientes de la cebolla como la quercetina, que se considera buena para la salud, no se escapan al agua y los nutrientes se pueden ingerir de manera eficiente. Debido a que no es necesario sumergir una cebolla en agua, no se necesita un proceso de

inmersión en agua en las fábricas donde se producen cebollas en rodajas a nivel industrial. Esto puede reducir el coste de producción.

5 Además, la cebolla de la presente invención no tiene propiedad que induce el lagrimeo. Esto puede mejorar significativamente las condiciones para cocinar en casa o en operaciones en fábricas a gran escala donde se producen cebollas peladas.

10 Debido a que la cebolla de la presente invención produce muy poca o ninguna pungencia, además, se pueden preparar fácilmente materias primas alimentarias procesadas que no implicaban el uso de cebollas en el pasado, como las materias primas vegetales no calentadas (es decir, las verduras precortadas), las materias primas vegetales calentadas (que permiten la preparación de cebollas fritas dulces en un corto período de tiempo), y los condimentos (PRENCISO, un aminoácido, pueden mejorar el sabor).

15 La cantidad de PRENCISO restante cuando se rompen las células de cebolla es significativamente mayor en la cebolla de la presente invención, en comparación con el caso de las variedades de cebolla existentes. Se confirma que PRENCISO tiene funciones de salud (patente JP 2007-210918 A) y se espera como material funcional. Sin embargo, en el caso de las variedades de cebolla existentes, PRENCISO se degrada y/o transforma durante el proceso de cocción y procesamiento. En consecuencia, no era fácil ingerir PRENCISO comiendo cebollas. En contraste, PRENCISO permanece en la cebolla de la presente invención sin degradarse o transformarse por la actividad de la aliinasa. Por lo tanto, PRENCISO se puede ingerir de manera fácil y eficiente.

2. Método para producir la cebolla de la presente invención

25 La cebolla de la presente invención se puede producir mediante una técnica de mutagénesis o recombinación de genes.

30 De acuerdo con una técnica que involucra mutagénesis, las semillas de cebolla pueden someterse a una técnica conocida de mutagénesis (por ejemplo, procesamiento químico usando metanosulfonato de etilo (EMS) o procesamiento físico usando rayos γ , rayos X o haces de iones pesados). Se puede usar cualquier haz de iones pesados sin limitación particular, siempre que se pueda inducir la mutagénesis. Los ejemplos de haces de iones pesados que se pueden usar incluyen haces de iones de nitrógeno, haces de iones de carbono, haces de iones de neón y haces de iones de argón. Una dosis de haces de iones pesados puede determinarse adecuadamente de acuerdo con el tipo de haz de iones a emplear o la cantidad de semilla. Se puede determinar de acuerdo con una tasa de germinación de las semillas irradiadas y una tasa de crecimiento normal de las mismas. Específicamente, es preferible una dosis que produzca una tasa de germinación de aproximadamente el 80 % o superior y una tasa de crecimiento normal entre las plantas germinadas del 50 % o superior. En el caso del haz de iones de neón, por ejemplo, la dosis del haz de iones pesados puede ser de 5 a 50 Gy, preferiblemente de 10 a 40 Gy, y más preferiblemente de 20 a 30 Gy.

40 Las variedades de semillas de cebolla no están particularmente limitadas, y se pueden usar semillas de las variedades existentes.

45 Las semillas mutagenizadas se cultivan de acuerdo con un procedimiento general para el cultivo de cebolla y entonces se les permite formar bulbos. Los bulbos de cebolla se someten al método de evaluación y selección descrito a continuación para obtener el bulbo de cebolla objetivo en la que se reduce la expresión del gen de la aliinasa. Los bulbos de cebolla seleccionados de este modo se someten a auto-fertilización para obtener semillas, las semillas resultantes se cultivan nuevamente y los bulbos de cebolla resultantes se someten a evaluación y selección. Este procedimiento puede repetirse más de una vez, para obtener las líneas de cebolla objetivo en las que la expresión del gen de la aliinasa se reduce de manera estable. Los tejidos de cebolla sometidos a evaluación y selección no se obtienen necesariamente de los bulbos de cebolla formados, y se pueden usar tejidos obtenidos de tejidos distintos de los bulbos, como las hojas en crecimiento.

50 De acuerdo con una técnica de recombinación de genes, se puede emplear una técnica que pueda inhibir (o eliminar) la expresión del gen de la aliinasa. Los ejemplos de dicha técnica incluyen la interrupción del gen de la aliinasa y/o la interrupción de una región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa. El término "región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa" utilizado en el presente documento se refiere a una región que regula la expresión del gen de la aliinasa (transcripción), y dicha región incluye una región promotora y/o una región potenciadora. El término "interrupción" se refiere a la introducción de una mutación en el gen de la aliinasa y/o la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa, para eliminar o inhibir la expresión del gen de la aliinasa.

55 Una mutación a introducir en el gen de la aliinasa y/o la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa no está particularmente limitada, siempre que pueda resultar en la eliminación o inhibición de la expresión del gen de la aliinasa. Se puede introducir una mutación por sustitución, eliminación, inserción y/o adición de uno o más nucleótidos. Por ejemplo, se puede eliminar una parte del gen de la aliinasa y/o la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa o su región completa. Se puede introducir una mutación en el gen de la aliinasa y/o en la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa mediante una técnica convencional que implica recombinación homóloga. Un ejemplo de ello es el doble cruce mediante recombinación homóloga. En resumen, el

gen de la aliinasa y/o la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa derivada de una cebolla hospedadora se clona en un vector común conocido por los expertos en la materia, para introducir el gen. La región del gen de la aliinasa o la región aguas arriba que incluye el gen de la aliinasa se puede obtener diseñando y sintetizando cebadores o sondas de acuerdo con la información de la secuencia de nucleótidos concerniente al gen de la aliinasa de la cebolla y seleccionando la biblioteca de ADNc o la biblioteca del genoma derivada de la cebolla hospedadora con el uso de los cebadores o sondas. Puede usarse cualquier vector conocido generalmente como vector de transformación de plantas. Por ejemplo, se pueden usar vectores binarios u otros tipos de vectores. Un vector binario contiene dos secuencias de borde de aproximadamente 25 pb del borde derecho (RB) y el borde izquierdo (LB) de *Agrobacterium* T-DNA, y el gen de la aliinasa y/o la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa pueden introducirse en una región entre las dos secuencias de borde. Se introduce una mutación en la secuencia de nucleótidos del gen de la aliinasa clonada y/o la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa clonada, para preparar un constructo de ADN que contiene el gen de la aliinasa mutagenizado y/o la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa mutagenizada. Se puede introducir una mutación, por ejemplo, mediante un método basado en PCR. Al introducir el constructo de ADN en una cebolla hospedadora, se realiza una recombinación homóloga entre el gen de la aliinasa mutagenizado y/o la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa mutagenizada en el constructo de ADN y el gen de la aliinasa y/o la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa en los cromosomas del hospedador. Por lo tanto, el gen de la aliinasa y/o la región reguladora de la expresión del gen de la aliinasa del hospedador se pueden interrumpir.

Un ejemplo de una técnica de transformación que comprende introducir el vector construido como anteriormente en una célula de cebolla hospedadora es un método que implica el uso de *Agrobacterium*. Alternativamente, el vector puede introducirse en una célula hospedadora mediante el método de la pistola de genes, la electroporación, un método que involucre el uso de un vector de virus, el método de inmersión floral o el método de disco de hoja. Las técnicas de transformación de la planta o el cultivo de tejidos se describen en, por ejemplo, Ko Shimamoto, Kiyotaka Okada (ed.), *Plant cell technology Series 15, Experimental protocol for model animals, From genetic technique to genomic analysis*, Shujunsha, 2001.

De acuerdo con una técnica que involucra el uso del sistema binario vector-*Agrobacterium*, las células vegetales, los callos o las secciones de tejido vegetal se preparan e infectan con *Agrobacterium* para introducir el gen mutagénico de la aliinasa y/o la región reguladora mutagénica de la expresión del gen de la aliinasa en células vegetales. En el momento de la transformación, se puede agregar un compuesto fenólico (acetosiringona) a un medio, y dichas células pueden transformarse eficientemente en el caso de monocotiledóneas, en particular.

Más específicamente, se prepara una solución de *Agrobacterium*, los callos o tejidos (por ejemplo, secciones de hojas, raíces, secciones de tallos o puntos de crecimiento) de la cebolla hospedadora se sumergen en la solución durante varios minutos, se elimina la humedad y el resultante se somete a co-cultivo en un medio sólido. Los callos son masas de células vegetales y se pueden inducir desde secciones de tejido vegetal o semillas maduras con el uso de un medio de inducción de callos. Los callos transformados o las secciones de tejido se seleccionan, y los callos se pueden regenerar en plantas jóvenes en un medio de regeneración. En el caso de las secciones de tejido, los callos son inducidos desde las secciones de tejido para regenerarse en plantas jóvenes. Alternativamente, los protoplastos pueden prepararse a partir de secciones de tejido y regenerarse en plantas jóvenes a través del cultivo de callos. Las plantas jóvenes así obtenidas se transfieren al suelo, después del enraizamiento, para reproducir las plantas. Las semillas pueden obtenerse de dichas plantas de acuerdo con técnicas de cultivo comunes (Tanikawa, T., Takagi, M., Ichii, M., 1996, *Plant regeneration from suspension cultures of onion (Allium cepa L.)*, *Plant Tissue Cult. Lett.* 13: 259-264; Eady CC, 2002, *Genetic Transformation of Onions*, In: Rabinowitch HD, Currah L. (eds), *Allium Crop Science: Recent Advances*, CABI Publishing, Nueva York, pp. 119-144).

Cuando se emplea el método de inmersión floral, por ejemplo, se prepara una solución de *Agrobacterium*, se sumergen en la solución capullos florales de cebollas hospedadoras que se cultivan para que desarrollen brotes florales inmaduros, se permite que las plantas crezcan en ese estado y las semillas entonces se cosechan. Las semillas cosechadas se siembran, las plantas transformadas se seleccionan y las plantas seleccionadas se transfieren al suelo y se dejan crecer en él. Así, se pueden obtener plantas de cebolla de genes recombinantes. Las plantas de cebolla así obtenidas se cultivan de acuerdo con un procedimiento de cultivo de cebollas convencional y se dejan formar los bulbos. Los bulbos de cebolla resultantes se someten al método de evaluación y selección descrito a continuación, y se obtienen bulbos de cebolla objetivo en los que se reduce la expresión del gen de la aliinasa. Los bulbos de cebolla seleccionados de este modo pueden auto-fertilizarse, las semillas resultantes se vuelven a cultivar y los bulbos de cebolla resultantes se evalúan y se seleccionan. Al repetir dicho procedimiento más de una vez, se puede obtener la línea de cebolla objetivo en la que se reduce de forma estable la expresión del gen de la aliinasa. Los tejidos de la cebolla sometidos a evaluación y selección no son necesariamente los bulbos de cebolla formados, y pueden utilizarse tejidos obtenidos de tejidos distintos de los bulbos, como las hojas en desarrollo.

3. Método de evaluación y selección de la cebolla

Las cebollas objetivo en las que se reduce la expresión del gen de la aliinasa se pueden seleccionar entre las cebollas producidas por el método descrito anteriormente y evaluadas por el método descrito a continuación.

(Preparación de la muestra de analito)

Con el fin de evitar variaciones en los resultados del ensayo o de la evaluación que se producen debido a los sitios de las plantas utilizadas como muestras de analito, se utilizan partes particulares de las plantas descritas a continuación como muestras de analito. Un bulbo de cebolla se divide en dos en el plano perpendicular al eje vertical del bulbo (es decir, el eje que conecta la placa basal al extremo superior del bulbo de cebolla) por una distancia de 1/3 a 1/2 de su altura desde el extremo superior del bulbo de cebolla, y se obtiene una muestra de analito de una catáfila en el centro del plano de corte de la parte superior, incluido el extremo superior o la parte inferior que incluye la placa basal (véase Figura 1). La "catáfila en el centro del plano de corte" es una capa superficial del plano de corte de la catáfila más interna que aparece en el plano de corte (una catáfila que rodea un capullo en el centro axial) entre las catáfilas en las proximidades. La "capa superficial" es, por ejemplo, una capa con un espesor de 2 mm a 10 mm desde el plano de corte. Cuando se seleccionan plantas individuales sobre la base de los resultados de varias mediciones, es preferible que una muestra de analito se derive de una región distinta del sitio que incluye el punto de crecimiento de la planta. Por ejemplo, la placa basal de un bulbo de cebolla (catáfilas) incluye el punto de crecimiento. Al mantener un sitio que incluye el punto de crecimiento, ventajosamente, la planta seleccionada se puede reproducir desde dicho sitio.

El tamaño de una muestra de analito no está particularmente limitado, siempre que la cantidad de la muestra sea suficiente para la evaluación y el ensayo.

Una muestra de analito puede romperse usando un Micropestle o molino de cuentas, según sea necesario. Las condiciones para la ruptura de la muestra pueden determinarse observando la configuración de la muestra rota.

(Nivel de expresión del gen de la aliinasa o de la proteína)

El nivel de expresión del gen de la aliinasa se puede medir de acuerdo con una técnica convencional utilizada para la cuantificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, transferencia Northern o PCR en tiempo real). Se emplea preferentemente la PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real puede llevarse a cabo con el uso de ADNc sintetizado a partir de la muestra de analito de acuerdo con una técnica convencional. Se puede usar cualquier par de cebadores siempre que el gen de la aliinasa pueda amplificarse, y la región a amplificar y su longitud no estén particularmente limitadas. La PCR en tiempo real se puede realizar con el uso de SYBR Green o sondas fluorescentes. El tipo de gen de mantenimiento utilizado para la corrección de los niveles de expresión génica entre muestras no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede usar un gen de ubiquitina.

En la presente invención, puede evaluarse una cebolla en la que el nivel de expresión del gen de la aliinasa es más bajo que el caso de las variedades de cebolla existentes y seleccionarse como una cebolla objetivo en la que la expresión del gen de la aliinasa se elimina o se reduce. Es preferible seleccionar una cebolla en la que el nivel de expresión del gen de la aliinasa medido por el método descrito anteriormente sea inferior a una quincuagésima parte, menos de una centésima, menos de una dos centésima, menos de una tres centésima, menos de una cuatro centésima, menos de una cinco centésima, menos de una seis centésima, menos de una siete centésima, menos de una ocho centésima, menos de una nueve centésima, menos de una milésima, menos de una dos milésima, menos de una tres milésima, menos de una cuatro milésima, menos de una cinco milésima, menos de una seis milésima, menos de una siete milésima, menos de una ocho milésima, menos de una nueve milésima, o menos de una diez milésima parte o inferior de los niveles de expresión del gen de la aliinasa en variedades de cebolla existentes.

El nivel de expresión de la proteína aliinasa se puede medir de acuerdo con una técnica convencional utilizada para la cuantificación de proteínas (por ejemplo, transferencia de Western o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)). Preferiblemente se emplea ELISA. Un anticuerpo anti-aliinasa utilizado para el ELISA puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. El antisuero no purificado puede usarse como anticuerpo policlonal, o puede usarse un anticuerpo policlonal purificado del antisuero. Con el uso de dos tipos de anticuerpos monoclonales, alternativamente, se puede realizar ELISA en sándwich. Ejemplos de animales a inmunizar incluyen conejos, ratas, cabras y pollos. Se pueden usar anticuerpos secundarios que comprenden enzimas capaces de detección, como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina, unidos a ellas, para la detección a través de ELISA. Una muestra diluida a una concentración cuantificable se somete a ELISA. Se rompe una muestra de analito y se extrae una solución de muestra inicial de la muestra de analito rota con el uso de un disolvente acuoso. La solución de inicio se diluye 1000 veces, preferiblemente de 10 a 1000 veces, más preferiblemente la solución de inicio está sin diluir hasta 100 veces diluida, y más preferiblemente está sin diluir hasta 50 veces diluida. Se puede usar una muestra de analito obtenida inmediatamente después de que la muestra se rompa, hasta 3 horas después (la duración después de que se rompa la muestra no está particularmente limitada).

En la presente invención, puede evaluarse una cebolla en la que el nivel de proteína aliinasa es más bajo que el caso de las variedades de cebolla existentes y seleccionarse como una cebolla objetivo en la que la expresión del gen de la aliinasa se elimina o se reduce. Es preferible seleccionar una cebolla en la que el nivel de expresión de la proteína aliinasa medido por el método descrito anteriormente sea una trigésima parte o inferior, más preferiblemente una quincuagésima parte o inferior, aún más preferiblemente una centésima parte o inferior, aún más preferiblemente una quinto centésima parte o inferior, y, además, preferiblemente una milésima parte o inferior,

en comparación con el nivel de proteína aliinasa en las variedades de cebolla existentes medidas en el mismo procedimiento.

5 Cuando algunos o todos los tejidos de la cebolla se rompen, el PRENCOSO, que es un sustrato para un componente pungente, se degrada de inmediato por la aliinasa y se produce ácido sulfénico, que es un precursor del componente pungente. Como se ha descrito anteriormente, en consecuencia, una cebolla evaluada y seleccionada sobre la base del nivel de expresión del gen de la aliinasa o de la proteína tiene propiedades de pungencia y de inducción de lagrimeo que ocurren cuando las células de la cebolla se rompen, que son significativamente más bajas que las de las variedades de cebolla en general. Por lo tanto, la pungencia y la propiedad de inducción de lagrimeo de una
10 cebolla se pueden evaluar sobre la base del nivel de expresión del gen de la aliinasa o de la proteína.

Además del método de evaluación y selección sobre la base del nivel de expresión del gen de la aliinasa o de la proteína descrito anteriormente, la cebolla de la presente invención se puede seleccionar mediante uno o más
15 métodos de evaluación y ensayo descritos a continuación sobre la base de las cantidades de un componente pungente y un componente lacrimógeno generado cuando se rompen algunos o todos los tejidos de cebolla.

(Evaluación funcional)

20 A través de la evaluación funcional, la propiedad de inducción de lagrimeo se percibe cuando se rompe una parte de una muestra de analito o se evalúa un grado de pungencia cuando se come una muestra de analito. En la presente invención, una cebolla se evalúa y se selecciona como una cebolla objetivo en la que se reducen las propiedades de pungencia y/o de lagrimeo cuando 2 o más paneles perciben una reducción aparente de la propiedad de pungencia y/o lagrimeo, en comparación con el caso de variedades de cebolla existentes.

25 (Cantidad de producción de ácido pirúvico)

Al medir la cantidad de ácido pirúvico producido cuando se rompen algunos o todos los tejidos de la cebolla, puede evaluarse indirectamente el grado de pungencia de una cebolla de la que se deriva una muestra de analito. La cantidad de ácido pirúvico producida se puede determinar rompiendo la muestra de analito, permitiendo que la
30 muestra rota reaccione con dinitrofenilhidracina inmediatamente después de 3 horas, y midiendo la absorbancia (515 nm) utilizando un espectrofotómetro. Una muestra de analito utilizada se diluye a una concentración cuantificable, preferiblemente la muestra de analito está sin diluir hasta 5 veces diluida. En la presente invención, una cebolla puede evaluarse y seleccionarse con una pungencia reducida cuando la cantidad de ácido pirúvico producida en la muestra de analito roto es menor que en el caso de las variedades de cebolla existentes. Es preferible seleccionar
35 una cebolla en la que la cantidad de ácido pirúvico producido que se mide por el método descrito anteriormente sea de 2,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o inferior, más preferiblemente 1,5 $\mu\text{mol/g}$ FW o inferior, aún más preferiblemente 1,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o inferior, y en particular preferiblemente 0,5 $\mu\text{mol/g}$ FW o inferior.

(Cantidad de PRENCOSO restante)

40 Cuando algunos o todos los tejidos de la cebolla se rompen, un precursor del componente pungente, PRENCOSO, de inmediato se degrada completamente en ácido sulfénico, ácido pirúvico y amoníaco por la aliinasa. En general, en consecuencia, no debe haber PRENCOSO en el tejido de cebolla roto. Al medir la cantidad de PRENCOSO en la solución que contiene los tejidos rotos (es decir, la cantidad de PRENCOSO restante) después de un período de
45 tiempo dado después de la rotura del tejido de la cebolla, en consecuencia, puede analizarse indirectamente la actividad de la aliinasa. La cantidad de PRENCOSO restante se puede medir rompiendo la muestra de analito y sometiendo la muestra obtenida de 0,5 minutos a 3 horas, y preferiblemente 3 horas después, a HPLC. En la presente invención, una cebolla puede evaluarse y seleccionarse con propiedades reducidas de pungencia o de inducción de lagrimeo cuando la cantidad de PRENCOSO restante después de que se rompa la muestra de analito es
50 mayor que en el caso de las variedades de cebolla existentes. Es preferible seleccionar una cebolla en la que la cantidad de PRENCOSO restante medida por el método descrito anteriormente sea de 2,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o superior, más preferiblemente 3,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o superior, aún más preferiblemente 4,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o superior, y en particular preferiblemente 5,0 $\mu\text{mol/g}$ FW o superior.

55 (Cantidad de producción de FL)

Al medir la cantidad de FL, un componente pungente y un componente lacrimógeno, producidos cuando se rompen algunos o todos los tejidos de la cebolla, se puede evaluar el grado de pungencia y la propiedad de inducción de lagrimeo de una cebolla a partir de la cual se deriva una muestra de analito. La cantidad de FL producida se puede
60 medir por HPLC de una muestra de inmediatamente a 3 minutos, y preferiblemente 1 minuto y 20 segundos después de que se rompa la muestra de analito. En la presente invención, una cebolla puede evaluarse y seleccionarse por tener propiedades reducidas de pungencia y de inducción de lagrimeo cuando la cantidad de FL producida en la muestra de analito roto es menor que en el caso de las variedades de cebolla existentes. Es preferible seleccionar una cebolla en la que la cantidad de FL producida medida por el método descrito anteriormente sea 1,0 x 10⁶ área del pico o inferior, más preferiblemente 9,0 x 10⁵ área del pico o inferior, 8,0 x 10⁵ área del pico o inferior, 7,0 x 10⁵ área del pico o inferior, o 6,0 x 10⁵ área del pico o inferior, y aún más preferiblemente 5,0 x 10⁵ área del pico o inferior.

inferior, $4,0 \times 10^5$ pico área o inferior, $3,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, $2,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, o $1,0 \times 10^5$ área del pico o inferior, relativa a los μl del extracto.

5 La cebolla de la presente invención producida, evaluada y seleccionada por los métodos descritos anteriormente se puede cultivar de acuerdo con un procedimiento general para las variedades de cebolla relevantes utilizadas.

10 La cebolla de la presente invención puede producirse mediante una técnica que implica la reproducción sexual o asexual. De acuerdo con una técnica que implica la reproducción sexual, la planta de cebolla de la presente invención se cruza con la segunda planta de cebolla para obtener semillas, las semillas resultantes se cultivan de acuerdo con una técnica de cultivo de cebollas convencional para obtener plantas, y se obtienen partes de las plantas resultantes. De este modo, pueden producirse la cebolla y una de sus partes de la presente invención. De acuerdo con las necesidades, puede evaluarse una cebolla resultante del cruce en el que se reduce la expresión del gen de la aliinasa y seleccionarse mediante el método descrito anteriormente. El "cruce" puede ser auto-fertilización, polinización de hermanos, retro-cruzamiento, cruce con la misma o con diferente una línea diferente, o cruce de grupo en masa. Una cebolla adecuada para el cruce de interés puede seleccionarse como la "segunda cebolla". Por ejemplo, la segunda cebolla se puede seleccionar entre variedades de líneas iguales o diferentes o variedades convencionales. La planta de cebolla que resulta del cruce puede someterse a un cruce una o más veces con el mismo procedimiento para obtener la cebolla de la presente invención. De acuerdo con una técnica que implica la reproducción asexual, se obtienen catáfilas de la cebolla de la presente invención, y las plantas se obtienen a través del cultivo de acuerdo con un procedimiento general de cultivo de cebolla. Alternativamente, se obtienen callos de la cebolla de la presente invención, los callos se regeneran en plantas jóvenes para obtener plantas. De este modo, pueden producirse la cebolla y una de sus partes de la presente invención. En la presente invención, una cebolla que tiene un historial de ser producida con el uso de la cebolla de la presente invención se conoce ocasionalmente como "progenie" de la planta de cebolla de la presente invención. Dicha "progenie" y una de sus partes están dentro del alcance de la presente invención, siempre que la expresión del gen de la aliinasa se reduzca en dicha "progenie" en comparación con el caso de las variedades existentes.

Ejemplos

30 De aquí en adelante, la presente invención se describe con mayor detalle con referencia a los ejemplos, aunque el alcance de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

[Ejemplo 1]

35 Producción de cebolla de primavera sin propiedades de pungencia y de inducción de lagrimeo

(1-1) Producción de bulbo de cebolla M1

40 Se introdujeron aproximadamente 1500 semillas (6,08 g) de Super Kita-momiji en una placa de Petri de plástico con un diámetro de 10 cm, y las semillas se irradiaron con haces de iones de neón a 20 Gy, y se prepararon semillas mutagenizadas de primera generación (en lo sucesivo denominadas "M1"). De las semillas M1 resultantes, se separaron 60 semillas y se sometieron a la prueba de germinación, para estimar la tasa de germinación y la tasa de desarrollo normal. Específicamente, se introdujo Golden Peatban en una bandeja de plástico acompañante, y la bandeja se llenó con 700 ml de agua del grifo. Después de 10 a 15 minutos, se sembraron 60 semillas en Golden Peatban que habían absorbido toda el agua y se hincharon hasta llenar la bandeja. La bandeja se dejó reposar en ese estado en una habitación durante la noche, se transfirió a un invernadero (15 °C) y entonces se dejó que las plantas crecieran allí. Un mes después de la siembra, la tasa de germinación era del 86,7 % y la tasa de plantas que desarrollaron las vainas de la segunda hoja era del 55,8 %.

50 De las semillas M1 restantes después de la prueba de germinación, se separaron 1450 semillas y se sembraron en una bandeja de células (en marzo), se continuó la crianza de plántulas en un invernadero y se asentaron 1000 plántulas en el campo (es decir, un surco) (en mayo). El cultivo posterior se realizó con el mismo procedimiento que con el cultivo de cebolla en Hokkaido. Las cebollas M1 (457 bulbos) se cosecharon (en septiembre).

55 (1-2) Selección de cebolla M1.

[Selección primaria]

60 a) Evaluación funcional del tejido roto en términos de nivel de propiedad de inducción de lagrimeo y olor a cebolla cruda

(Preparación de la muestra)

65 Se pelaron cubiertas y capas marrones hasta que todas las partes marrones desaparecieron completamente en la periferia, excepto en el extremo superior del bulbo. Con el uso de una cuchilla con una hojilla reemplazable, parte de las capas más externas del bulbo de la cebolla pelada (aproximadamente 5 a 10 g) se pela para cortar en una

dirección longitudinal del bulbo. Cuando el espesor de las capas de corte era inferior a aproximadamente 1 mm, las capas ubicadas dentro de las mismas se cortaron y se usaron. Las capas de corte se cortaron adicionalmente en una dirección horizontal y las capas se plegaron, de modo que en el extremo superior se alineara una capa con su extremo inferior. Las capas plegadas se introdujeron en una bolsa de plástico con cierre (18 cm x 20 cm) para uso doméstico (las capas se introdujeron para colocarse sustancialmente en el centro de la bolsa de plástico con cierre). La bolsa de plástico con cierre se cerró para minimizar la cantidad de aire que quedaba en la bolsa. La bolsa cerrada se puso en una placa de metal y las capas plegadas se golpearon con un martillo de goma en ese estado (aproximadamente 15 a 20 segundos), para romper las capas de cebolla hasta que las capas pierdan su forma.

10 (Evaluación funcional)

Inmediatamente después de romper las capas de cebolla, la bolsa de plástico con cierre se acercó a la cara (la nariz y la boca), se presionó el botón de inicio del temporizador (con la función de cuenta ascendente), la bolsa de plástico con cierre se abrió inmediatamente después, la nariz y la boca se acercaron a la abertura de la bolsa de plástico y se llevó a cabo la evaluación funcional utilizando los 2 indicadores que se describen a continuación:

1. si se percibe o no el olor de la cebolla cruda cuando se rompe; y
2. el tiempo requerido antes de que se detecte la propiedad de inducción de lagrimeo después de que se rompa la cebolla cruda.

20 Inmediatamente después de la evaluación funcional, la bolsa de plástico con cierre se cerró y se introdujo en una bolsa de plástico más grande, a fin de evitar la difusión de la propiedad de inducción de lagrimeo o el olor para evitar su influencia en la posterior evaluación funcional.

25 Como resultado de la evaluación funcional, se determinó que las muestras que mostraban un olor débil a cebolla cruda o propiedades de inducción de lagrimeo eran muestras positivas, los bulbos de cebolla de las muestras positivas se identificaron mediante etiquetado y las muestras se refrigeraron a 10 °C o inferior.

30 (Puntos a tener en cuenta)

Desde el punto de vista de la prevención de la difusión de un factor lacrimógeno y un componente de olor, la preparación de la muestra y la evaluación funcional se llevaron a cabo en un proyecto de sobremesa, y se permitió que en dichos procedimientos se llevaran guantes de goma para evitar que quedara el olor en la mano.

35 Una muestra se sometió a una evaluación funcional, y la siguiente muestra se sometió a una evaluación funcional al menos 3 minutos más tarde, para evitar que la sensibilidad disminuyera.

(Verificación de la sensibilidad de la evaluación funcional).

40 Mientras se continuaba la evaluación de la muestra de cebollas, las cebollas no irradiadas que exhibían propiedades de inducción de lagrimeo y variedades de cebollas comercializadas con propiedades reducidas de inducción de lagrimeo y olor a cebolla cruda se sometieron a una evaluación funcional similar y se examinó la sensibilidad. Antes de la selección primaria, por separado, independientemente de que se pudieran distinguir o no entre sí cebollas frutales, cebollas para ensaladas y Super Kita-momiji cuando se rompían sus capas, se realizó una prueba ciega, para verificar la fiabilidad de la evaluación y la selección sobre la base de las propiedades de inducción de lagrimeo y el olor de la cebolla cruda que se detecta al romper las capas en bolsas selladas. Como resultado, se seleccionaron cebollas frutales con propiedades reducidas de inducción de lagrimeo y se determinó que la evaluación funcional en el momento de la rotura del tejido era suficiente para la selección primaria.

50 (Resultados de la selección primaria)

Como resultado de la selección primaria, se seleccionaron 38 bulbos de cebolla con propiedades reducidas de olor de cebolla cruda o de inducción de lagrimeo.

55 [Selección secundaria]

a) Medición de la cantidad de factor lacrimógeno (FL) producido en una solución que contiene capas rotas

60 En el mismo procedimiento que con la selección primaria, se tomaron de nuevo muestras de algunas de las capas más externas de los bulbos de cebolla que se determinaron positivos a través de la selección primaria y se almacenaron a 10 °C. Se introdujo agua destilada en la bolsa de plástico con cierre que contiene capas de cebolla en una cantidad equivalente a la mitad del peso de las capas cortadas, y la bolsa se cerró para minimizar la cantidad de aire que queda en la bolsa. Las capas de cebolla se golpearon con un martillo de goma a través de la bolsa de plástico con cierre y se rompieron. (Se presionó el botón de inicio del temporizador (con la función de cuenta ascendente) cuando se inició la ruptura de las capas y se registró la duración después de que se rompieron las capas). Después de que se rompieron las capas, la bolsa de plástico con cierre se agitó para reunir la mayor

cantidad de contenido posible en un sitio de la bolsa, y la bolsa de plástico se perforó con una jeringa de 1 ml con una aguja en una posición cercana a la posición donde se reunieron las capas rotas, para extraer una solución que contiene cebolla rota. La aguja en la punta de la jeringa se reemplazó con un filtro de 0,2 µm o 0,45 µm y la solución extraída que contenía cebolla rota se filtró. Inmediatamente después, se tomaron muestras de 1 µl de la solución filtrada que contenía la cebolla rota en ese estado utilizando una microjeringa, se aplicó a HPLC y entonces se inspeccionaron en términos de la cantidad de FL producida. (Se registró la duración desde el inicio de la rotura hasta la aplicación en la HPLC). El filtrado restante se puso en hielo. Después de que la muestra se aplicó a HPLC, la solución que contenía cebolla rota se recuperó con el uso de una jeringa con una aguja, y se registró la cantidad de la solución resultante.

b) Ensayo de la actividad FLS de una solución que contiene capas rotas

Al filtrado (10 µl) en el que se analizó la cantidad de FL producida, se mezclaron 123 µl de tampón fosfato 50 mM (pH 6,5). Se separó una fracción (20 µl) del diluyente resultante y se diluyó con 40 µl de tampón fosfato 50 mM (pH 6,5). Con el uso de 10 µl del diluyente resultante, se llevó a cabo el ensayo de la actividad FLS a través de HPLC en el procedimiento descrito a continuación.

[Procedimiento de ensayo de la actividad FLS]

1. A un tubo Eppendorf nuevo, se introdujeron 40 µl de aliinasa de ajo (50 unidades/ml).
2. A la mezcla resultante, se le añadieron 10 µl de jugo 1/20 (es decir, el diluyente preparado anteriormente), seguido de pipeteo 20 veces.
3. Se añadieron 20 µl de PRENCSO (20 mg/ml), seguido de pipeteo 5 veces, y el tubo se cerró inmediatamente.
4. Se inició el temporizador programado para 3 minutos.
5. La tapa del tubo Eppendorf se abrió cuando el tiempo restante llegó a 20 segundos, se tomaron muestras de 1 µl de la solución con el uso de una microjeringa de 10 µl cuando el temporizador alcanzó el tiempo establecido (3 minutos), y la solución se introdujo en la HPLC.
6. La entrada de la HPLC y la microjeringa se lavaron con agua destilada.

c) Ensayo de la actividad de la aliinasa en una solución que contiene capas rotas

La actividad FLS se analizó utilizando el filtrado en el que se analizó la cantidad de FL producida (antes de la dilución) como fuente de aliinasa, y se determinó el nivel de actividad de la aliinasa en función de la región del pico de FL que aparece en la HPLC.

[Procedimiento de ensayo de la actividad de la aliinasa]

1. A un tubo Eppendorf nuevo, se introdujeron 20 µl del filtrado.
2. A la mezcla resultante, se le añadieron 5 µl de rLFS, seguido de pipeteo 20 veces.
3. Se añadieron 10 µl de PRENCSO (20 mg/ml), seguido de pipeteo 5 veces, y la tapa del tubo se cerró inmediatamente.
4. Se inició el temporizador programado para 3 minutos.
5. La tapa del tubo Eppendorf se abrió cuando el tiempo restante llegó a 20 segundos, se tomaron muestras de 1 µl de la solución con el uso de una microjeringa de 10 µl cuando el temporizador alcanzó el tiempo establecido (3 minutos), y la solución se introdujo en la HPLC.
6. La entrada de la HPLC y la microjeringa se lavaron con agua destilada.

d) Condiciones para el análisis por HPLC

Las condiciones de HPLC empleadas en a) a c) anteriores se describen a continuación. Dado que todas las técnicas de ensayo implican el análisis por HPLC de la cantidad de producción de FL, se emplean las mismas condiciones de HPLC.

[Condiciones para el análisis por HPLC]

Columna: ODS (SenshuPak ODS, 4,6 mm x 25 cm)
 Fase móvil: metanol:ácido trifluoroacético acuoso al 0,005 % = 3:7
 Detección: 254 nm
 Temperatura: 35 °C
 Caudal: 0,6 ml/min

(Resultados de la selección secundaria)

Como resultado de la selección secundaria, se seleccionaron 9 bulbos (Números individuales, B0266, B0108, B0277, B0297, B0383, B0317, B0280 y B0258).

(1-3) Producción de bulbo de cebolla M2

Las cebollas M1 seleccionadas (9 bulbos: B0266, B0108, B0277, B0297, B0383, B0317, B0280, B0258 y B0371) se dejaron auto-fertilizar. Como resultado, se obtuvieron aproximadamente 350 semillas (71 semillas de B0108, aproximadamente 80 semillas de B0297, aproximadamente 200 semillas de B0280 y una semilla de B0371) (en adelante, "generación M2"). Las semillas M2 obtenidas se cultivaron con el mismo procedimiento que en el caso de las semillas M1 y se obtuvieron 197 bulbos de cebolla M2 (se obtuvieron 18 bulbos de B0108, 73 bulbos de B0297 y 106 bulbos de B0280).

10 (1-4) Selección de cebolla M2

(Preparación de la muestra de analito)

Con el fin de evitar variaciones en el ensayo o resultados de evaluación que se producen debido a los sitios de las plantas utilizadas como muestras de analito, a continuación, se utilizan partes particulares de las plantas descritas como muestras de analito. Un bulbo de cebolla se divide en dos en el plano perpendicular al eje vertical del bulbo (es decir, el eje que conecta la placa basal al extremo superior de un bulbo de cebolla) por una distancia de 1/3 a 1/2 de su altura desde el extremo superior del bulbo de cebolla, y se obtiene una muestra de analito de una catáfila en el centro del plano de corte de la parte superior, incluido el extremo superior o la parte inferior que incluye la placa basal (véase Figura 1). Las partes de la cebolla son como se describe anteriormente.

Se tomaron muestras de los tejidos de la cebolla (600 mg) de las cebollas M2 de acuerdo con el método descrito en la sección anterior ("Preparación de la muestra de analito") y se introdujeron en el tubo Eppendorf de cierre seguro de 2 ml que contiene 3 bolas de zirconia (ϕ : 3 mm). Se añadió agua destilada (0,6 ml), los tejidos se rompieron utilizando un molino de cuentas (MM300, QIAGEN) a 30 Hz durante 2 minutos, y este procedimiento se repitió 3 veces. La muestra de tejido de cebolla rota (10 μ l) se añadió a los pocillos de una placa ELISA. La placa ELISA que contenía las muestras se dejó reposar en una incubadora ajustada a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, la placa ELISA se retiró de la incubadora y entonces se lavó en el procedimiento que se describe a continuación: (i) la solución se eliminó de todos los pocillos; (ii) se añadió tampón de lavado (0,05 % de monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano (equivalente a Tween 20) en NaCl 140 mM, Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 10 mM (pH 7,4)) a 300 μ l/pocillo, el tampón de lavado se eliminó inmediatamente y este procedimiento se repitió 3 veces; (iii) después de que el tampón de lavado se eliminara 3 veces, la placa ELISA se arrojó sobre una poyata forrada con una toalla de papel para eliminar completamente el tampón de lavado de los pocillos. Se añadió una solución de bloqueo (BSA al 1 % (p/v) en tampón de recubrimiento (tampón de carbonato-bicarbonato de sodio 50 mM (pH 9,6)) a la placa de ELISA sometida a las etapas de lavado (i) a (iii) descritas anteriormente a 300 μ l/pocillo. La placa de ELISA se dejó reposar en ese estado en una incubadora ajustada a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se repitieron las etapas de lavado (i) a (iii). El anticuerpo primario (es decir, el antisuero de rata anti-aliinasa diluido 1000 veces con tampón de dilución (BSA al 0,1 % en 140 mM NaCl, Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,4) se añadió a la placa ELISA lavada a 100 μ l/pocillo. La placa ELISA se dejó reposar durante 3 horas momento en el que se usó una incubadora ajustada a 37 °C, o la placa se dejó reposar durante la noche (16 a 22 horas) cuando se usó un refrigerador a 4 °C, para proceder a la reacción con el anticuerpo primario. Posteriormente, la placa de ELISA se sometió a las etapas (i) a (iii) de lavado descritas anteriormente. El anticuerpo secundario (es decir, la molécula completa de IgG anti-rata conjugada con POD Sigma A0545 diluida 10.000 veces con tampón de dilución) se añadió a la placa ELISA lavada a 200 μ l/pocillo. La placa ELISA que contenía el anticuerpo secundario se dejó reposar en una incubadora ajustada a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se repitieron las etapas (i) a (iii) de lavado. Un reactivo de color (una solución de sustrato TBA ELISA, Bio-Rad 172-1066) se añadió a la placa ELISA lavada a 100 μ l/pocillo. Inmediatamente después, se permitió que la reacción de desarrollo de color procediera mientras se sometía la placa ELISA a agitación con agitación a 60 rpm en una incubadora a 25 °C. Se midió la absorbancia a 650 nm utilizando un lector de microplacas (Emax Molecular Dynamics) dentro de los 10 a 60 minutos posteriores a la adición del reactivo de color. En lugar de la muestra extraída, se usó aliinasa purificada (producida por el método descrito en JP 2009-254344 A) para preparar una serie de dilución y la serie de dilución se usó para realizar ensayos en el mismo procedimiento, se preparó la curva de calibración en función de los resultados del ensayo y la absorbancia medida en la muestra extraída se convirtió en la concentración de aliinasa. Además, el nivel de proteína total en el extracto medido por el método de Bradford se convirtió al nivel por ng de la proteína extraída.

Basándose en el patrón de selección, de manera que la cantidad de desarrollo de color a través de ELISA por proteína extraída es 1/10 o inferior a la de las cebollas no irradiadas, se seleccionaron 18 bulbos de cebolla con un nivel de expresión de proteína aliinasa más bajo.

60 (1-5) Auto-fertilización y producción de semillas de bulbos M2 seleccionados (Producción de generación M3)

De mayo a octubre

Número de semillas recolectadas

65 Se obtuvieron 3250 semillas M3 (280 semillas del n.º 300, 55 semillas del n.º 438, 56 semillas del n.º 444, 800

semillas del n.º 455, 86 semillas del n.º 479, 66 semillas del n.º 482, 960 semillas del n.º 486, 176 semillas del n.º 487, 265 semillas del n.º 489, 75 semillas del n.º 511, 61 semillas del n.º 512 y 367 semillas del n.º 515).

(1-6) Cultivo de bulbo a partir de semilla M3

5

De marzo a septiembre

10 De entre las 3250 M3 semillas, 1078 semillas (100 semillas del n.º 300, 55 semillas del n.º 438, 56 semillas del n.º 444, 100 semillas del n.º 455, 86 semillas del n.º 479, 66 semillas del n.º 482, 100 semillas del n.º 486, 176 semillas del n.º 487, 100 semillas del n.º 489, 75 semillas del n.º 511, 61 semillas del n.º 512 y 100 semillas del n.º 515) se cultivaron con el mismo procedimiento que las semillas M1 y M2, y se obtuvieron 466 bulbos de cebolla M3 (81 bulbos del n.º 300, 28 bulbos del n.º 438, 22 bulbos del n.º 444, 74 bulbos del n.º 455, 29 bulbos del n.º 479, 15 bulbos del n.º 482, 67 bulbos del n.º 487, 37 bulbos del n.º 489, 60 bulbos del n.º 511, 4 bulbos del n.º 512 y 49 bulbos del n.º 515).

15

(1-7) Selección de bulbos de cebolla M3.

De noviembre a marzo

20 De entre los bulbos de cebolla M3, aquellos con actividad reducida de aliinasa se seleccionaron utilizando la cantidad de PRENCOSO restante después de que se rompieran las catáfilas como indicador. El patrón de selección fue de 3,26 µmol/g FW o superior de la cantidad de PRENCOSO restante. Este patrón de selección se determinó porque se reconoció la pungencia reducida cuando la actividad de la aliinasa se redujo a 1/40 mediante una evaluación funcional cuando se compararon el nivel de actividad de la aliinasa y los resultados de la evaluación funcional durante el examen preliminar. La cantidad de PRENCOSO restante cuando la actividad de la aliinasa se redujo a 1/40 (es decir, 3,26 µmol/g) se determinó midiendo la cantidad de PRENCOSO restante cuando la actividad de la aliinasa se redujo a 1/40 a través del experimento modelo usando una variedad general de cebolla (Sapporo-ki, 6 bulbos) cultivada en el mismo campo que los bulbos de cebolla M3. Las catáfilas de algunas de las cebollas seleccionadas se sometieron a evaluación funcional para determinar la presencia o ausencia de pungencia.

30

Estos bulbos seleccionados se sometieron a evaluación funcional y ensayo de la actividad aliinasa utilizando hojas durante el cultivo dirigidas a la auto-fertilización y la producción de semillas, a fin de identificar características distintivas.

35 Como resultado, 9 bulbos en los que la cantidad de PRENCOSO restante fue de 3,26 µmol/g FW o superior (líneas # 2, # 6, # 10, # 11, # 37, # 230, # 262, # 263 y # 651) fueron seleccionados.

(1-8) Auto-fertilización y producción de semillas de bulbos M3 seleccionados (Producción de generación M4)

40 De mayo a octubre

Se obtuvieron semillas M4 (1687 semillas (328 semillas de la línea # 6, 338 semillas de la línea # 10, 13 semillas de la línea # 230 y 1008 semillas de la línea # 263)).

45 Por separado, la línea # 2 se sometió a cruce con la línea # 6 y se obtuvieron 2 semillas.

(1-9) Cultivo de bulbo de semilla M4

De marzo a septiembre

50

De las 1689 semillas M4, se cultivaron 400 semillas (200 semillas de la línea # 6 y 200 semillas de la línea # 10) con el mismo procedimiento que con las semillas M1 a M3, y se obtuvieron 226 bulbos de cebolla M4 (158 semillas de la línea # 6 y 68 semillas de la línea # 10).

55 [Ejemplo 2]

Varias medidas

(2-1) Medición de la cantidad de ácido pirúvico producido cuando se rompen los tejidos

60

Se tomaron muestras de los tejidos de cebolla (600 mg) de acuerdo con el método descrito en la sección "(1-4) Preparación de la muestra de analito" anterior y se introdujeron en el tubo con cierre de seguridad Eppendorf de 2 ml que contiene 3 bolas de zirconia (φ: 3 mm). Se añadió agua destilada (0,6 ml), los tejidos se rompieron utilizando un molino de cuentas (MM300, QIAGEN) a 30 Hz durante 2 minutos, y este procedimiento se repitió 3 veces. El resultado se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y entonces se centrifugó a 15.000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante fue designado como muestra. La muestra (20 µl) se introdujo en los pocillos de

65

una placa de 96 pocillos, se añadieron 43 µl de agua y 66 µl de una solución de DNPH 30 minutos después de que se rompieran los tejidos, y se dejó que la reacción avanzara a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 66 µl de NaOH 1,5 M para terminar la reacción, seguido de mezcla con pipeteo 3 o más veces. La absorbancia a 515 nm se analizó utilizando un espectrofotómetro. La curva de calibración se preparó utilizando los valores medidos con el mismo procedimiento con el uso de una serie de dilución de una solución de piruvato de sodio en lugar de la muestra extraída. La absorbancia medida de la muestra extraída se convirtió en la cantidad de ácido pirúvico.

(2-2) Medición de la cantidad de PRENCOSO restante 3 horas después de la rotura de los tejidos

Se tomaron muestras de los tejidos de cebolla (600 mg) de acuerdo con el método descrito en la sección "(1-4) Preparación de la muestra de analito" anterior y se introdujeron en el tubo con cierre de seguridad Eppendorf de 2 ml que contiene 3 bolas de zirconia (φ: 3 mm). Se añadió agua destilada (0,6 ml), los tejidos se rompieron utilizando un molino de cuentas (MM300, QIAGEN) a 30 Hz durante 2 minutos, y este procedimiento se repitió 3 veces. El producto resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas y entonces se centrifugó a 15.000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 µm y el resultante se designó como muestra. La cantidad de PRENCOSO se midió de acuerdo con una técnica convencional (patente JP 2009-254344 A).

(2-3) Medición de la cantidad de factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompen los tejidos

Los tejidos de cebolla (400 mg) recogidos de acuerdo con el método descrito en la sección "Preparación de la muestra de analito" anterior se introdujeron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Los tejidos se rompieron utilizando un Micropestle durante 20 segundos, los tejidos rotos se centrifugaron a 15.000 rpm y 4 °C durante 10 segundos inmediatamente después, y se analizó la cantidad del factor lacrimógeno (FL) en 1 µl del sobrenadante mediante HPLC 1 minuto y 20 segundos después de que se rompieran los tejidos.

Se emplearon las condiciones para el análisis de HPLC que se describen a continuación. En dichas condiciones para el análisis de HPLC, se detectó el factor lacrimógeno (FL) a un tiempo de retención de aproximadamente 9,6 minutos.

[Condiciones para el análisis por HPLC]

Columna: ODS (SenshuPak ODS, 4,6 mm x 25 cm)
 Fase móvil: metanol:ácido trifluoroacético acuoso al 0,005 % = 3:7
 Detección: 254 nm
 Temperatura de la columna: 35 °C
 Caudal: 0,6 ml/min

(2-4) Medición del nivel de expresión de la proteína aliinasa mediante ELISA

Los tejidos de cebolla que se rompieron con el mismo procedimiento que con la medición de la cantidad de ácido pirúvico producido se designaron como muestras, y los niveles de expresión de la proteína aliinasa en las muestras se midieron mediante el método similar a ELISA descrito en la sección "(1-4) Selección de la cebolla M2" anterior.

(2-5) Medición del nivel de expresión del gen de la aliinasa mediante PCR en tiempo real

Con el uso del kit RNeasy Plant Mini (Qiagen), se extrajo ARN de 100 mg de los tejidos de cebolla crioconservados a -80 °C de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración del ARN muestreado se midió utilizando NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies), y se llevó a cabo la transcripción inversa utilizando la mezcla maestra de qPCR RT ReverTra Ace con gDNA Remover (Toyobo Co., Ltd.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para sintetizar ADNc. La cuantificación génica se llevó a cabo utilizando los grupos de cebadores que se muestran en la tabla a continuación y la mezcla THBRERBIRD SYBR qPCR (Toyobo Co., Ltd.) en el Sistema rápido de PCR en tiempo real 7900 HT (Applied Biosystems). Los resultados se corrigieron con el nivel de expresión de un gen de mantenimiento de la ubiquitina.

Cebadores de aliinasa:

Cebador directo: 5'-AATGAGACCTCCATCCCCATC-3' (SEQ ID NO: 1)
 Cebador inverso: 5'-TCGAAACCCTCTCCACTTTG-3' (SEQ ID NO: 2)

Cebadores de ubiquitina:

Cebador directo: 5'-ACGATTACACTAGAGGTGGAGAGCTC-3' (SEQ ID NO: 3)
 Cebador inverso: 5'-CCTGCAAATATCAGCCTCTGCT-3' (SEQ ID NO: 4)

(2-6) Demostración de datos y análisis estadístico

Los valores medidos se representaron en términos de "media ± desviación típica" y el análisis estadístico se realizó de acuerdo con el método de Dunnett. Los niveles de significancia se indicaron al 5 % (*) y al 1 % (**).

[Ejemplo 3]

Resultados de diversas medidas y evaluación de bulbo de cebolla M4

(3-1) Evaluación funcional

Se obtuvieron muestras de las dos líneas de bulbos de cebolla M4 (la línea # 6 y la línea # 10, 20 bulbos cada una) y 5 bulbos de la variedad de control Sapporo-ki de acuerdo con el método descrito en la sección "(1-4) Preparación de la muestra de analito" anterior. Se pidió al menos a dos paneles que evaluaran las funciones mediante el método descrito en la sección "Evaluación funcional" anterior. Es decir, los bulbos de cebolla M4 se compararon con los bulbos de control, y si se observaba o no una reducción significativa en los grados de propiedad que induce el lagrimeo cuando se rompieron algunas muestras y/o exhibía un olor pungente cuando se rompieron o se comieron algunas muestras. Como resultado, ninguno de los bulbos de la línea # 6 o # 10 exhibió pungencia (Tabla 1).

Tabla 1

	Número de bulbos sometidos a evaluación funcional	Número de bulbos que exhiben pungencia
Control	5	5
#6	20	0
#10	20	0

(3-2) Cantidad de ácido pirúvico producido cuando se rompen los tejidos

De acuerdo con el método descrito en la sección "(2-1) Medición de la cantidad de ácido pirúvico producida cuando se rompen los tejidos", se midieron las cantidades de ácido pirúvico que se producen cuando se rompieron las dos líneas de bulbos de cebolla M4 (la línea # 6 y la línea # 10, 19 bulbos cada una) y la variedad de control Sapporo-ki (5 bulbos).

Los resultados se muestran en la Figura 2. En comparación con las muestras de control, la cantidad de ácido pirúvico producido en la línea # 6 y la línea # 10 se redujo significativamente. Estos resultados fueron consistentes con los resultados de la evaluación funcional.

(3-3) Cantidad de PRENCSO restante 3 horas después de que se rompan los tejidos

De acuerdo con el método descrito en la sección "(2-2) Medición de la cantidad de PRENCSO restante 3 horas después de que se rompan los tejidos" anterior, las muestras se obtuvieron de las dos líneas de bulbos de cebolla M4 (la línea # 6 y línea # 10, 19 bulbos cada una) y la variedad de control Sapporo-ki (5 bulbos), y se midieron las cantidades de PRENCSO restantes 3 horas después de que se rompieran las muestras.

Los resultados se muestran en la Fig. 3. En comparación con las muestras de control, PRENCSO se mantuvo en la línea # 6 y la línea # 10. Dichas cebollas no se habían descubierto en el pasado. Además, estos resultados fueron consistentes con los resultados de la evaluación funcional y los resultados del análisis de la cantidad de producción de ácido pirúvico.

(3-4) Cantidad de factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompen los tejidos

De acuerdo con el método descrito en la sección "(2-3) Medición de la cantidad de factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompen los tejidos" anterior, las muestras se obtuvieron de las dos líneas de bulbos de cebolla M4 (la línea # 6 y la línea # 10, 19 bulbos cada una) y la variedad de control Sapporo-ki (5 bulbos), y se midieron las cantidades del factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompieron las muestras.

Los resultados se muestran en la Fig. 4. En comparación con las muestras de control, la cantidad del factor lacrimógeno (FL) producido en la línea # 6 y la línea # 10 se redujo significativamente.

(3-5) nivel de expresión de la proteína aliinasa

De acuerdo con el método descrito en la sección "(2-4) Medición del nivel de expresión de la proteína aliinasa a través de ELISA" anterior, las muestras se obtuvieron de las dos líneas de bulbos de cebolla M4 (la línea # 6 y la línea # 10, 19 bulbos cada uno) y la variedad de control Sapporo-ki (5 bulbos), y se midieron los niveles de expresión de la proteína aliinasa mediante ELISA.

Los resultados se muestran en la Fig. 5. En comparación con las muestras de control, los niveles de expresión de la proteína aliinasa se suprimieron significativamente en la línea # 6 y la línea # 10.

(3-6) Nivel de expresión del gen de la aliinasa

De acuerdo con el método descrito en la sección "(2-5) Medición del nivel de expresión del gen de la aliinasa mediante PCR en tiempo real" anterior, se midieron los niveles de expresión del gen de la aliinasa en las dos líneas de bulbos de cebolla M4 (la línea # 6 y la línea # 10, 3 bulbos cada una) y la variedad de control Sapporo-ki (3 bulbos) mediante RT-PCR cuantitativa.

Los resultados se muestran en la Fig. 6 en términos de la proporción del gen de la aliinasa al gen de la ubiquitina. En comparación con las muestras de control, las proporciones del gen de la aliinasa al gen de la ubiquitina en la línea # 6 y la línea # 10 fueron de 1/187 y de 1/1000, respectivamente. Por lo tanto, se confirmó que la expresión del gen de la aliinasa se había suprimido significativamente.

En base a los resultados descritos anteriormente y los resultados del ELISA que demuestran la reducción del nivel de expresión de la proteína aliinasa, se encontró que la línea # 6 y la línea # 10 estaban libres de pungencia debido a que la expresión de la aliinasa se suprimió en ellas.

[Ejemplo 4]

Verificación de la actividad FLS en la línea # 6 y la línea # 10

Como se describe en la sección "(3-4) Cantidad de factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompen los tejidos" anterior, se confirmó que la cantidad de FL producida cuando se rompieron los tejidos se suprimió significativamente en la línea # 6 y la línea # 10. Esto sugiere que la actividad FLS se suprime, además de la actividad de la aliinasa. La aliinasa purificada se prepara a partir de un ajo de acuerdo con una técnica convencional (patente JP 2009-254344 A), y se añadieron 12,5 unidades de la aliinasa purificada obtenida a los tejidos de cebolla de la línea # 6 y la línea # 10 obtenida con el mismo procedimiento que con la sección "(3-4)" anterior, los tejidos de cebolla se rompieron, y se midió la cantidad de factor lacrimógeno (FL) producido en el procedimiento descrito anteriormente. Para comparación, las muestras se obtuvieron de la variedad de control Sapporo-ki (5 bulbos) y se midieron las cantidades del factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompieron las muestras mediante el método descrito anteriormente.

Los resultados se muestran en la Fig. 7. Con la adición de aliinasa cuando se rompió el tejido de cebolla, las cantidades del factor lacrimógeno (FL) producido en la línea # 6 y la línea # 10 se convirtieron en equivalentes a las del control. Estos resultados demuestran que las cantidades del factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompieron la línea # 6 y la línea # 10 son pequeñas porque se suprime la aliinasa y el FL per se funciona sin problemas.

Los presentes inventores designaron las semillas obtenidas de la línea # 6 como *Allium cepa* HFG-01 y se depositaron internacionalmente con el Número de Acceso NCIMB 42219 en NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido, el 19 de febrero de 2014. La dirección escrita en el certificado de depósito es la del laboratorio de desarrollo donde trabaja el solicitante de la presente invención, y el depositante es el solicitante de la presente invención.

[Ejemplo 5]

Inducción de callo a partir de bulbo de cebolla M4

Las hojas exteriores de los bulbos de cebolla M4 (línea # 6) se pelaron, se escindió la plúmula en el centro (hojas en desarrollo, incluida la placa basal, Fig. 8) y entonces se esterilizó en una solución acuosa de clorito de sodio al 1 % durante 30 minutos. Después de enjuagar la plácula esterilizada dos veces con agua estéril, las regiones dañadas por la esterilización (las hojas más externas y la placa basal) se eliminaron con una cuchilla quirúrgica en condiciones asépticas. Posteriormente, las hojas en desarrollo se cortaron horizontalmente en secciones transversales con un espesor de aproximadamente 0,5 mm y se pusieron en un medio de inducción de callos. El medio de inducción de callos utilizado en este caso fue medio Murashige y Skoog (en adelante denominado "MS") que contiene ácido 4-fluorofenoxiacético 50 µM (en adelante, "4-FPA"), N6 (2-isopentenil) adenina 1 µM (en adelante denominado "2iP"), sacarosa 0,1 M, hidrolizado de caseína al 0,1 % y goma de gelano al 0,2 %, y su pH se ajustó a 5,8. El cultivo se realizó a 25 °C a la luz durante 12 horas (40 µmol/m²/s). Las secciones transversales se agrandaron 1 semana después del inicio del cultivo, y entonces se inició la formación de callos. Dos semanas después del inicio del cultivo, las secciones transversales ampliadas se cortaron en trozos de aproximadamente 5 mm cuadrados y los trozos resultantes se pusieron en un nuevo medio de inducción de callos. Dos semanas después del inicio del subcultivo, se observó una proliferación de callo suficiente, y el subcultivo se realizó transfiriendo los trozos a un medio de subcultivo de callo fresco (medio MS que contenía 4-FPA 50 µM, 2iP 1 µM, sacarosa 0,1 M y goma de gelano al 0,3 %) cada 4 a 6 semanas para obtener callos. Los presentes inventores

designaron dicho callo como HFG-01C y lo depositaron internacionalmente con el Número de Acceso FERM BP-22260 en el Depositorio de Microorganismos de Patentes (NPMO), Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) (# 120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japón) el 25 de diciembre de 2013.

5 [Ejemplo 6]

Regeneración a partir de callos y producción de planta

10 (1) Regeneración

Los callos obtenidos en el Ejemplo 5 se cultivaron en un medio de regeneración (medio MS que contenía 2iP 1 μ M, sacarosa 0,1 M y goma de gelano al 0,3 %) a 25 °C a la luz durante 12 horas (40 μ mol/m²/s). Se observaron estructuras de superficie lisa aproximadamente 1 mes después del inicio del cultivo (Fig. 9). El producto de cultivo que contiene estas estructuras se transfirió a un medio de regeneración nuevo cada 4 a 6 semanas. Los brotes se diferenciaron del producto de cultivo que se había transferido a otro medio de regeneración aproximadamente 2 veces.

15 (2) Enraizamiento

20 Los brotes diferenciados obtenidos en (1) se cultivaron en medio MS que contenía sacarosa 0,1 M, goma de gelano al 0,2 % y agar al 0,5 % a 25 °C a la luz durante 12 horas (40 μ mol/m²/s). Se observó diferenciación de la raíz 1 mes después del inicio del cultivo (Fig. 10), y las plantas se obtuvieron de callos.

Estos resultados demuestran que los callos inducidos a partir de los bulbos de cebolla M4 pueden cultivarse y crecer, y los callos pueden regenerarse en plantas.

25 [Ejemplo 7]

Producción de semillas a partir del bulbo de cebolla M4 a través del cruce en masa (producción de la generación M5)

Los bulbos de cebolla M4 (7 bulbos; línea # 6) se sometieron a cruce en masa y se obtuvieron 610 semillas M5. Por separado, 17 bulbos de cebolla M4 (línea # 10) se sometieron a cruce en masa y se obtuvieron 421 semillas M5.

35 [Ejemplo 8]

Análisis del gen de la aliinasa en el bulbo de cebolla M4 (línea # 6, línea # 10)

Para encontrar la razón por la cual la expresión del gen de la aliinasa se reduce en la línea # 6 y la línea # 10, se analizaron exhaustivamente las diferencias en los genes que se expresan en las cebollas de la línea # 6 y en las cebollas generales (es decir, aquellas que exhiben propiedades de pungencia y de inducción de lagrimeo debido a la expresión génica de la aliinasa no se reduce en ese caso) utilizando un secuenciador de próxima generación mediante el método descrito a continuación.

45 Los bulbos de cebolla M4 (3 bulbos; la línea # 6) y los 3 bulbos de cebolla de control de la misma variedad que la línea # 6 y que exhiben pungencia, que se sometieron a auto-fertilización el mismo número de veces que la línea # 6, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y entonces se crioconservaron a -80 °C.

Se pelaron los bulbos de cebolla congelados, se fraccionaron 100 mg de tejidos de cebolla y se extrajo el ARN total de los mismos utilizando el kit RNeasy Plant Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones. El ARN total se sometió a tratamiento con ADNasa utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen) y el RNase-Free DNase Set (Qiagen). Después del tratamiento, el ARN total se sometió a la medición de la concentración y la verificación de calidad utilizando Nanodrop (Nanodrop Technologies) y Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). A través de la verificación de la calidad, se confirmó que la muestra exhibía A260/A280 de 1,8 o más y un índice de integridad del ARN de 8,0 o superior, y se preparó una biblioteca de secuencias usando el kit de preparación de muestras de ARN TruSeq (Illumina) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(Condiciones de secuenciación)

60 Método de análisis: Extremo emparejado; número de analitos: 6; número de carriles: 3; número de nucleótidos a leer: 100 nucleótidos/lectura

(Procesamiento de datos)

65 Los datos obtenidos se procesaron en el procedimiento descrito a continuación.

- Se utilizó una fórmula de cálculo denominada "castidad" para eliminar los datos con una baja pureza fluorescente. La "castidad" está representada por una fórmula $I1/(I1 + I2)$ en la que "I1" representa la señal máxima emitida por 4 tipos de nucleótidos y "I2" representa la señal posterior. En este ejemplo, los datos se seleccionaron bajo las condiciones de $I1/(I1 + I2) > 0,6$.
- Los datos seleccionados se clasificaron de acuerdo con la información del índice específico del analito para cada analito.
- Se eliminaron las secuencias de lectura que comprenden secuencias adaptadoras, y se extrajo un par de lecturas que contenían el 90 % o más de nucleótidos que mostraban un valor de calidad de 20 o superior. Todos los datos de los analitos se utilizaron para realizar el ensamblaje de novo utilizando Trinity (URL: <http://trinityrnaseq.sourceforge.net/index.html> versión 2013-02-25).
- Los datos ensamblados (la secuencia de transcripción putativa) se anotaron mediante la búsqueda de BLAST. Se empleó BLASTX como programa de anotación y RefSeq-honggi, RefSeq-microbial y RefSeq-plant (NCBI) y la base de datos integrada que comprende las secuencias de aminoácidos registradas como Allieae de acuerdo con la clasificación del NCBI, y sus secuencias de genes que se convirtieron en las secuencias de aminoácidos se emplearon como base de datos.

Los parámetros BLASTX son los siguientes: `eval=1E-5/num_alignments 100/ outfmt "6 qseqid sseqid pident length mismatch gapopen qstart qend sstart send eval bitscore qlen slen stitle qcovs qcovhsp"`. Se emplearon condiciones predeterminadas.

- Los datos para los analitos se asignaron a la secuencia de transcripción putativa utilizando Trinity para el análisis de expresión.
- En base a los resultados del mapeo, los niveles de expresión génica se compararon entre dos grupos con el uso de edgeR, y se extrajeron las secuencias genéticas que muestran diferencias en los niveles de expresión entre dos grupos. Se determinó que había una diferencia significativa cuando un valor de p era de 0,05 o menos y la tasa de descubrimiento falso (FDR) era de 0,01 o inferior.

Como resultado del análisis BLASTX, se anotaron un total de 29 genes como aliinasas, como la aliinasa de cebolla, las sustancias similares a la aliinasa o los precursores de la aliinasa (Fig. 11).

Se encontró que uno de estos genes se reducía para expresarse en los 3 bulbos de cebolla de la línea # 6 a un nivel significativo, y se encontró que se expresaba en los 3 bulbos de cebolla de control (en adelante, este gen de la aliinasa se denomina "gen de la aliinasa 1" por conveniencia). La Fig. 12 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la aliinasa 1.

El gen de la aliinasa 1 (Gen n.º 1 en la Fig. 11) exhibió el nivel de expresión más alto entre los 29 genes anotados como aliinasas en los bulbos de cebolla de control. Estos resultados demuestran que, entre los genes de aliinasa en células de cebolla, el gen de la aliinasa 1 es el gen más influyente en el nivel de actividad aliinasa de las células de cebolla.

Hasta la fecha, se han registrado 13 tipos de aliinasas de cebolla en el GenBank (por ejemplo, con los números de acceso AAA32639.1 y AAA92463.1). Esto puede deberse al hecho de que existen algunas diferencias en las secuencias de nucleótidos de varios genes entre diferentes variedades de cebolla, además del hecho de que los genes de la aliinasa de cebolla son genes de múltiples copias y que los rasgos de las aliinasas son diferentes entre las raíces y los bulbos de las cebollas (King et al., A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome, *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 52-62, 1998; Do et al., Genomic organization of a novel root alliinase gene, ALL1, in onion, *Gene*, 325, 17-24, 2004; Masamura et al., Chromosomal organization and sequence diversity of genes encoding lachrymatory factor synthase in *Allium cepa* L. *Genes/Genomes/Genetics* 2: 643-651, 2012). Además de la presencia de una pluralidad de genes de aliinasa, el grado de influencia de cada gen de la aliinasa en el nivel de actividad aliinasa en células de cebolla no es evidente. Cuando se pretende la producción de cebollas en las que se reduce la expresión del gen de la aliinasa, por consiguiente, no fue posible determinar el gen de la aliinasa diana a eliminar o suprimir. Además, no fue posible determinar los tipos de genes de aliinasa a eliminar o suprimir que eran necesarios para eliminar o inhibir eficazmente la expresión del gen de la aliinasa. En consecuencia, fue difícil identificar los genes de la aliinasa diana.

En base a los resultados descritos anteriormente, se identificó el gen de la aliinasa que es el más influyente en el nivel de actividad de la aliinasa en células de cebolla entre una pluralidad de genes de aliinasa existentes en el genoma de la cebolla. Además, los resultados demuestran que las cebollas en las que el nivel de expresión del gen de interés (es decir, el gen de la aliinasa 1) es notablemente bajo no muestran sustancialmente pungencia.

Específicamente, el gen de la aliinasa 1 es el principal gen de la aliinasa en un bulbo de cebolla, la eliminación o reducción de la expresión del gen de la aliinasa 1 es suficiente para eliminar o reducir la expresión de todos los genes de la aliinasa en un bulbo de cebolla, y así puede reducirse la propiedad de inducción de lagrimeo de una cebolla.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> House Foods Group Inc.

5 <120> Cebolla sin sabor picante y síntesis de factor lacrimógeno

<130> PH-5867-PCT

10 <150> JP 2013-096551
<151> 2013-05-01

<160> 5

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador

25 <400> 1
aatgagacct ccatcccat c 21

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador

35 <400> 2
tcgaaacct ctccacttg 20

<210> 3
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> cebador

45 <400> 3
acgattacac tagaggtgga gagctc 26

<210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> cebador

55 <400> 4
cctgcaaata tcagcctctg ct 22

60 <210> 5
<211> 479
<212> PRT
<213> Allium cepa

ES 2 699 989 T3

<400> 5

Met Glu Ser Tyr His Lys Val Gly Ser Asn Lys Met Pro Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Ile Leu Ile Cys Ile Ile Met Ser Ser Phe Val Asn Asn Asn Ile Ala
 20 25 30

Gln Ala Lys Val Thr Trp Ser Leu Lys Ala Ala Glu Glu Ala Glu Ala
 35 40 45

Val Ala Asn Ile Asn Cys Ser Gly His Gly Arg Ala Phe Leu Asp Gly
 50 55 60

Ile Leu Ser Asp Gly Ser Pro Lys Cys Glu Cys Asn Thr Cys Tyr Thr
 65 70 75 80

Gly Ala Asp Cys Ser Glu Lys Ile Thr Gly Cys Ser Ala Asp Val Ala
 85 90 95

Ser Gly Asp Gly Leu Phe Leu Glu Glu Tyr Trp Gln Gln His Lys Glu
 100 105 110

Asn Ser Ala Val Leu Val Ser Gly Trp His Arg Met Ser Tyr Phe Phe
 115 120 125

Asn Pro Val Ser Asn Phe Ile Ser Phe Glu Leu Glu Lys Thr Ile Lys
 130 135 140

Glu Leu His Glu Ile Val Gly Asn Ala Ala Ala Lys Asp Arg Tyr Ile
 145 150 155 160

Val Phe Gly Val Gly Val Thr Gln Leu Ile His Gly Leu Val Ile Ser
 165 170 175

Leu Ser Pro Asn Met Thr Ala Thr Pro Cys Ala Pro Gln Ser Lys Val
 180 185 190

Val Ala His Ala Pro Tyr Tyr Pro Val Phe Arg Glu Gln Thr Lys Tyr
 195 200 205

Phe Asp Lys Lys Gly Tyr Glu Trp Lys Gly Asn Ala Ala Asp Tyr Val
 210 215 220

ES 2 699 989 T3

Asn Thr Ser Thr Pro Glu Gln Phe Ile Glu Met Val Thr Ser Pro Asn
 225 230 235 240

Asn Pro Glu Gly Leu Leu Arg His Glu Val Ile Lys Gly Cys Lys Ser
 245 250 255

Ile Tyr Asp Met Val Tyr Tyr Trp Pro His Tyr Thr Pro Ile Lys Tyr
 260 265 270

Lys Ala Asp Glu Asp Ile Met Leu Phe Thr Met Ser Lys Tyr Thr Gly
 275 280 285

His Ser Gly Ser Arg Phe Gly Trp Ala Leu Ile Lys Asp Glu Thr Val
 290 295 300

Tyr Asn Lys Leu Leu Asn Tyr Met Thr Lys Asn Thr Glu Gly Thr Ser
 305 310 315 320

Arg Glu Thr Gln Leu Arg Ser Leu Lys Ile Leu Lys Glu Val Ile Ala
 325 330 335

Met Val Lys Thr Gln Lys Gly Thr Met Arg Asp Leu Asn Thr Phe Gly
 340 345 350

Phe Gln Lys Leu Arg Glu Arg Trp Val Asn Ile Thr Ser Leu Leu Asp
 355 360 365

Lys Ser Asp Arg Phe Ser Tyr Gln Lys Leu Pro Gln Ser Glu Tyr Cys
 370 375 380

Asn Tyr Phe Arg Arg Met Arg Pro Pro Ser Pro Ser Tyr Ala Trp Val
 385 390 395 400

Lys Cys Glu Trp Glu Glu Asp Lys Asp Cys Tyr Gln Thr Phe Gln Asn
 405 410 415

Gly Arg Ile Asn Thr Gln Ser Gly Glu Gly Phe Glu Ala Gly Ser Arg
 420 425 430

Tyr Val Arg Leu Ser Leu Ile Lys Thr Lys Asp Asp Phe Asp Gln Leu
 435 440 445

Met Tyr Tyr Leu Lys Asn Met Val Glu Ala Lys Arg Lys Thr Pro Leu
 450 455 460

Ile Lys Gln Leu Ser Asn Asp Gln Ile Ser Arg Arg Pro Phe Ile
 465 470 475

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta de cebolla o una progenie o una de sus partes en la que la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente y el gen de la aliinasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (a) o (b):
- 10 (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5; o
 (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 % o superior a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa, en donde la planta de cebolla no se obtiene exclusivamente por un proceso esencialmente biológico.
- 15 2. La planta de cebolla o la progenie o una de sus partes de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las cantidades de un componente pungente y un componente lacrimógeno producidos cuando se rompe una célula de cebolla se reducen en comparación con el caso de una variedad existente.
- 20 3. Un método para producir una planta de cebolla o una de sus partes en donde la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente, el método que comprende las siguientes etapas:
- (i) inducir mutagénesis en una semilla de cebolla por haces de iones pesados;
 (ii) cultivar la semilla de cebolla mutagenizada para obtener una planta de cebolla o una de sus partes; y
 (iii) seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes que muestre los rasgos descritos a continuación de la planta de cebolla obtenida o una de sus partes:
- 25 la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente y el gen de la aliinasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (a) o (b):
- 30 (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5; o
 (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 % o superior con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa.
- 35 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la etapa (iii) comprende seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes que muestre uno o más rasgos adicionales seleccionados de
- a) las cantidades de un componente pungente y un componente lacrimógeno producidos cuando se rompe una célula de cebolla disminuyen en comparación con el caso de una variedad existente;
 b) la cantidad de ácido pirúvico producido cuando se rompe una célula de cebolla disminuye en comparación con el caso de una variedad existente;
 40 c) la cantidad de PRENCOS restante después de que se rompa una célula de cebolla aumenta en comparación con el caso de una variedad existente; y
 d) la cantidad de un factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompe una célula de cebolla disminuye en comparación con el caso de una variedad existente.
- 45 5. Una planta de cebolla o una de sus partes de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente que se produce mediante un método que comprende las siguientes etapas:
- 50 (i) inducir mutagénesis en una semilla de cebolla por haces de iones pesados;
 (ii) cultivar la semilla de cebolla mutagenizada para obtener una planta de cebolla o una de sus partes; y
 (iii) seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes que muestre los rasgos descritos a continuación de la planta de cebolla obtenida o una de sus partes:
- 55 la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente y el gen de la aliinasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (a) o (b):
- 60 (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5; o
 (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 % o superior con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa.
- 65 6. La planta de cebolla o una de sus partes de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la etapa (iii) comprende seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes que muestre uno o más rasgos adicionales seleccionados de
- a) las cantidades de un componente pungente y un componente lacrimógeno producidos cuando se rompe una célula de cebolla disminuyen en comparación con el caso de una variedad existente;

- b) la cantidad de ácido pirúvico producido cuando se rompe una célula de cebolla disminuye en comparación con el caso de una variedad existente;
- c) la cantidad de PRENCOSO restante después de que se rompa una célula de cebolla aumenta en comparación con el caso de una variedad existente; y
- 5 d) la cantidad de un factor lacrimógeno (FL) producido cuando se rompe una célula de cebolla disminuye en comparación con el caso de una variedad existente.

7. Un método para evaluar la pungencia de una planta de cebolla o una de sus partes, que comprende analizar el nivel de expresión del gen de la aliinasa en la planta de la cebolla o una de sus partes, en donde el gen de la aliinasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (a) o (b):

10

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5; o
- (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 % o superior a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa, y
- 15

si la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente, se evalúa que la pungencia de la planta de cebolla o una de sus partes disminuye.

8. Un método para seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes en el que las cantidades de un componente pungente y un componente lacrimógeno producidos disminuyen en comparación con el caso de una variedad existente,

20

el método comprende analizar el nivel de expresión del gen de la aliinasa en una planta de cebolla o una de sus partes y seleccionar una planta de cebolla o una de sus partes en el que la expresión del gen de la aliinasa se reduce a menos de una quincuagésima parte en comparación con el caso de una variedad existente,

25

en donde el gen de la aliinasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (a) o (b):

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5; o
- (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 % o superior con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y que tiene actividad aliinasa.
- 30

9. Un alimento procesado que comprende la planta de cebolla o la progenie o una parte de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, o la planta de cebolla o una parte de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6.

35

Fig. 1

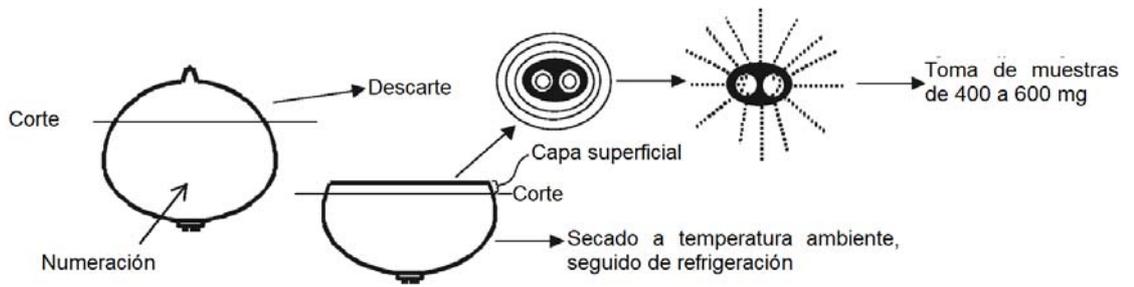


Fig. 2

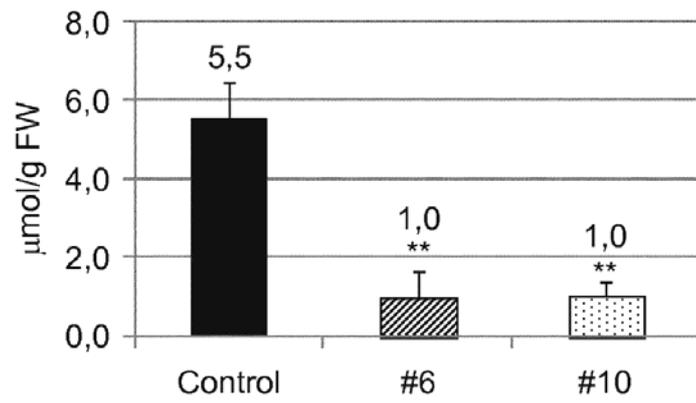


Fig. 3

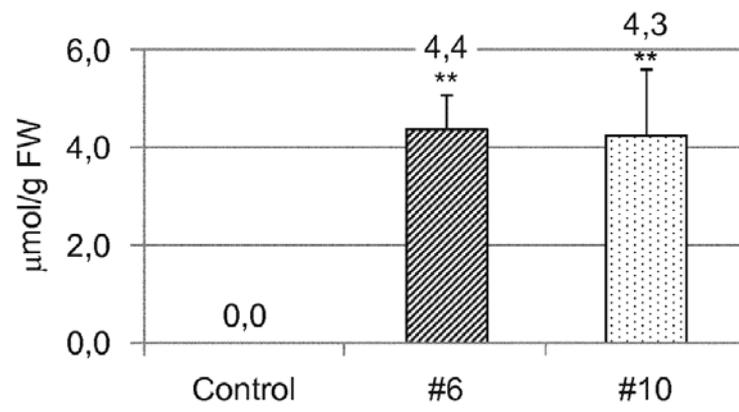


Fig. 4

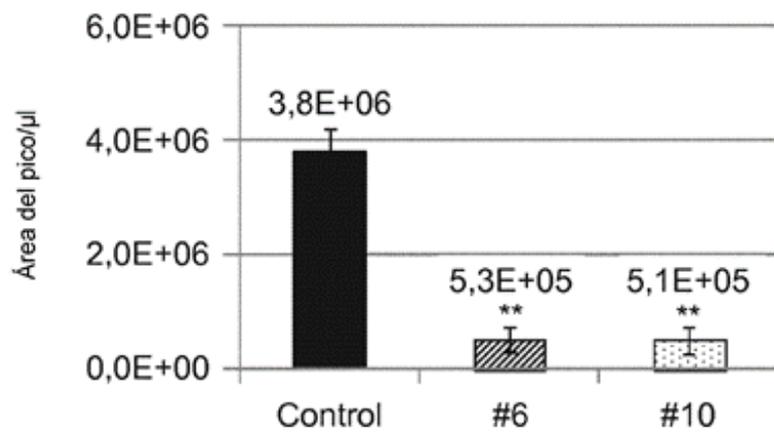


Fig. 5

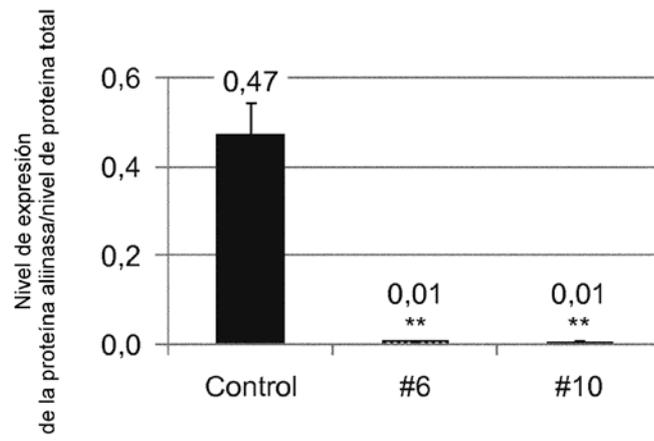


Fig. 6

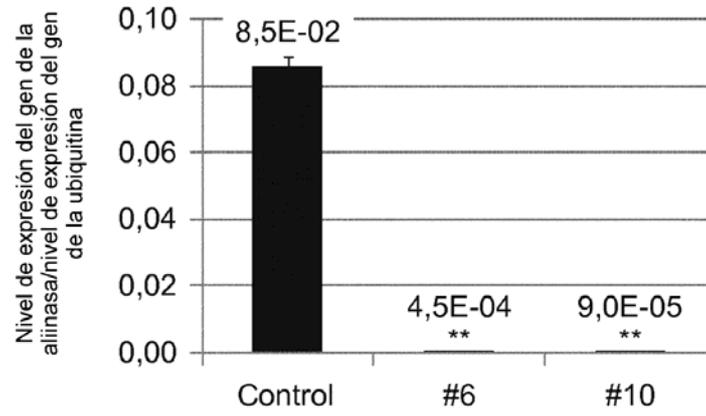


Fig. 7

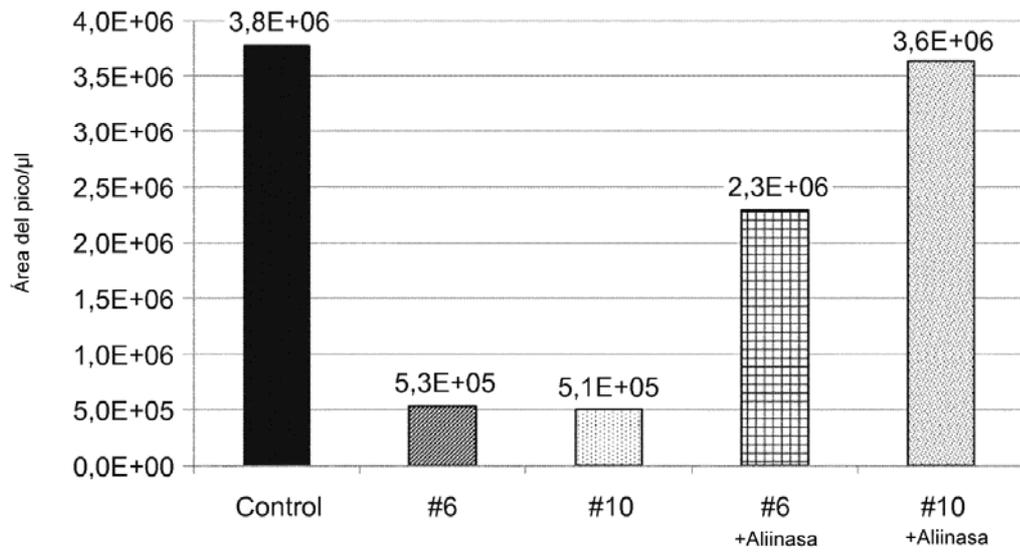


Fig. 8



Fig. 9

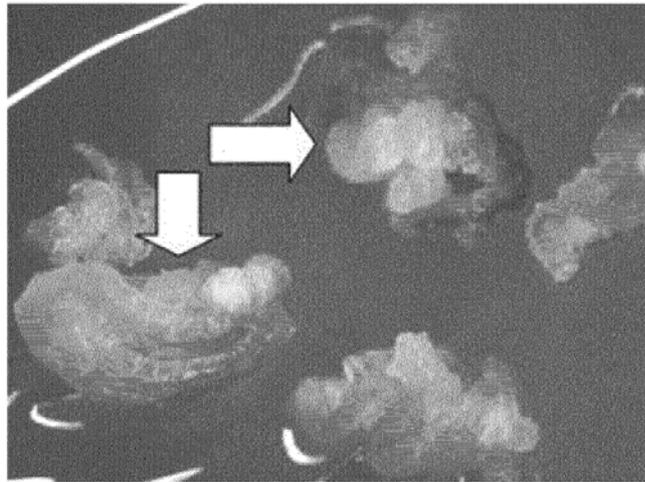


Fig. 10

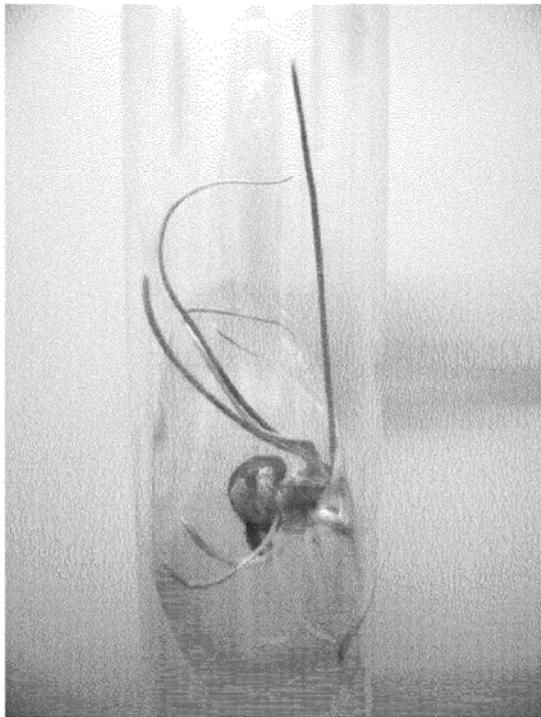


Fig. 11

Gen n.º	Nivel de expresión						Valor p	FDR	Resultados de la anotación	Identidad de secuencia con el Gen 1 (%)
	#6-1	#6-2	#6-3	Control 1	Control 2	Control 3				
1	0,03	0,09	0,01	1066,44	120,36	68,41	2,9E-15	2,0E-12	Aliinasa	
2	0,50	0,47	0,58	0,53	0,04	0,00	4,3E-01	1,0E+00	De tipo aliinasa	62,8
3	0,01	0,15	0,00	0,03	0,00	0,00	3,2E-01	8,9E-01	De tipo aliinasa	62,5
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	1,1E-01	5,4E-01	De tipo aliinasa	62,5
5	0,33	0,00	0,25	0,72	0,27	0,52	1,6E-01	6,7E-01	De tipo aliinasa	57,0
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	2,2E-01	7,7E-01	De tipo aliinasa	56,8
7	0,12	0,01	0,10	0,28	0,00	0,06	5,3E-01	1,0E+00	De tipo aliinasa	56,8
8	1,72	1,06	0,97	1,16	1,33	1,83	5,4E-01	1,0E+00	De tipo aliinasa	47,0
9	4,48	4,66	4,29	3,86	4,28	3,77	8,9E-01	1,0E+00	De tipo aliinasa	46,1
10	0,85	0,81	0,94	0,83	0,34	1,62	6,9E-01	1,0E+00	De tipo aliinasa	41,9
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0E+00	1,0E+00	De tipo aliinasa	32,1
12	11,53	10,46	7,83	12,12	22,63	18,87	1,1E-01	5,4E-01	De tipo aliinasa	31,7
13	0,00	0,00	0,00	0,48	0,00	0,00	3,5E-02	2,7E-01	De tipo aliinasa	30,7
14	0,39	0,39	0,17	0,00	0,17	0,28	4,5E-01	1,0E+00	De tipo aliinasa	30,5
15	2,36	2,14	2,94	1,15	2,86	3,12	8,4E-01	1,0E+00	De tipo aliinasa	27,3
16	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	1,5E-01	6,5E-01	De tipo aliinasa	25,5
17	4,86	4,43	5,14	8,32	11,59	11,48	4,1E-02	3,0E-01	De tipo aliinasa	21,0
18	1,42	0,92	1,16	1,32	1,44	2,46	2,9E-01	8,7E-01	De tipo aliinasa	16,9
19	0,00	0,00	0,34	0,00	0,00	0,00	2,3E-01	7,8E-01	De tipo aliinasa	16,1
20	0,00	0,06	0,13	0,01	3,59	4,60	9,9E-04	2,0E-02	De tipo aliinasa	15,5
21	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,14	8,9E-02	4,9E-01	Aliinasa	15,3
22	0,00	0,00	0,13	0,00	0,25	0,23	3,6E-01	9,1E-01	Precursor de aliinasa	14,8
23	0,05	0,00	0,56	10,54	0,05	0,11	1,8E-02	1,8E-01	De tipo aliinasa	14,3
24	3,98	4,55	5,19	0,56	0,00	0,00	1,8E-03	3,1E-02	De tipo aliinasa	14,1
25	0,21	0,00	0,00	0,46	0,00	0,21	3,3E-01	8,9E-01	De tipo aliinasa	13,7
26	0,00	0,00	0,00	0,13	0,39	0,00	3,7E-02	2,8E-01	De tipo aliinasa	13,7
27	0,00	0,00	0,00	0,29	0,05	0,16	2,5E-02	2,2E-01	De tipo aliinasa	12,9
28	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,25	8,5E-02	4,7E-01	De tipo aliinasa	9,4
29	0,53	0,87	0,77	0,68	1,79	1,57	2,3E-01	7,9E-01	De tipo aliinasa	9,2

Fig. 12

Secuencia de aminoácidos codificada por el gen 1 de la aliinasa (SEQ ID NO: 5)

MESYHKVGSNKMPSELLILICIMSSFVNNNTAQAKVTWSLKAEEAEAVANINCSGHGRAFLDGIILSDGSPKCECNT
CYTGADCSEKITGCSADVASGDGLFLEEYWQHKENS AVL VSGWHRMSYFFNPVSNFISFELEKTIKELHEIVGNAA
AKDRYIVFGVGV TQLIHGLVISLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPV FREQTKYFDKKG YEWKGNAADYVNTSTPEQ
FIEMVTSPNNPEGLLRHEVIKGCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDIMLFTMSKYTGHSRFRGWALIKDET VYNKL
LNYMTKNTEGTSRETQLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLPQSEYCN
YFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDKDCYQTFQNGRINTQSGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKT
PLIKQLSNDQISRRPFI