

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 201**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 5/12 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2007 E 11008499 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2428112**

54 Título: **Método de escrutinio para seleccionar plantas que muestran una decoloración superficial inducida por heridas reducida y planta y partes de planta así obtenidas**

30 Prioridad:

06.01.2006 EP 06075039

17.03.2006 EP 06075645

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

20.09.2019

73 Titular/es:

**RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.
(100.0%)**

**Burgemeester Crezeelaan 40
2678 KX De Lier, NL**

72 Inventor/es:

VAN DUN, CORNELIS MARIA PETRUS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 725 201 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de escrutinio para seleccionar plantas que muestran una decoloración superficial inducida por heridas reducida y planta y partes de planta así obtenidas

Campo de la invención

- 5 La presente descripción se refiere a plantas que muestran una decoloración superficial inducida por heridas ausente o reducida y a las partes y la progenie de las mismas.

Antecedentes de la invención

- 10 Debido a la creciente demanda, el procesamiento de productos frescos, en particular la lechuga, se ha expandido significativamente en los últimos años. La recolección y el procesamiento de la lechuga implican un extenso corte de las hojas, lo que induce una fuerte respuesta a la herida. Esta respuesta a la herida conduce a un rápido deterioro del producto procesado. Este deterioro se manifiesta por decoloración debido al pardeamiento o enrojecimiento enzimáticos en y alrededor de la superficie de la herida, la respiración y la desecación debida a la transpiración. Especialmente, el pardeamiento o enrojecimiento enzimático se consideran de gran importancia, ya que determinan directa o indirectamente la calidad general de la lechuga envasada recién cortada.

- 15 Además, como consecuencia del deterioro, puede aumentar significativamente el número demicroorganismos, lo que puede comprometer la seguridad de los alimentos. La naturaleza altamente perecedera de la lechuga procesada conduce a una fuerte percepción de pérdida de color, olor desagradable y pérdida de textura por parte del consumidor, lo que dificulta un crecimiento mayor que el actual del llamado mercado de conveniencia.

- 20 Para inhibir el proceso de deterioro, se han desarrollado muchos tratamientos químicos o físicos posteriores a la cosecha que pueden aplicarse para desacelerar el deterioro de la lechuga procesada.

- 25 Entre estos se encuentran el envasado de lechuga recién cortada bajo una atmósfera modificada, la aplicación de recubrimientos comestibles, el tratamiento de choque térmico y la adición de productos químicos, que inhiben el pardeamiento enzimático. Cuando la lechuga recién cortada se envasa en una atmósfera de oxígeno reducido a bajas temperaturas, el pardeamiento enzimático se puede reducir sustancialmente. Sin embargo, tal entorno con bajo contenido de oxígeno y modificado conduce a la respiración anaerobia, lo que crea un sabor desagradable y un olor desagradable del producto, que se percibe como muy poco atractivo.

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

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

- 35 Los productos químicos que pueden aplicarse pueden ser, por ejemplo, agentes reductores como la vitamina C, agentes quelantes como el EDTA, agentes complejantes como la ciclodextrina e inhibidores enzimáticos como la L-cisteína. La aplicación de productos químicos en alimentos frescos obviamente implica problemas de seguridad alimentaria y requiere aprobación regulatoria. Se puede pensar en las combinaciones de las tecnologías posteriores a la cosecha descritas anteriormente y, en última instancia, el procedimiento aplicado es un compromiso entre la eficacia tecnológica, el coste y la seguridad alimentaria.

Independientemente de la tecnología aplicada, la mejora de la calidad posterior a la cosecha de la lechuga procesada tendrá un coste y, por lo tanto, existe una clara necesidad en la técnica de proporcionar alternativas que eliminen o reduzcan la necesidad de aplicar tecnologías físicas o químicas posteriores a la cosecha.

45 Compendio de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar plantas que muestren una decoloración por enrojecimiento o pardeamiento significativamente reducida tras la herida. La decoloración tras la herida también puede ser visible en partes de las plantas, tales como tallos, semillas, frutos, hojas, flores, tubérculos, brotes.

- 50 La invención describe un método para el escrutinio de una población de plantas o partes de plantas en busca de la presencia de individuos que muestran una decoloración superficial inducida por heridas reducida en comparación con una planta de control o una parte de la planta, cuyo método comprende:

- a) proporcionar una población de plantas o partes de las plantas de la población;

b) crear una superficie herida en las plantas o partes de las plantas que se van a escrutar y en las plantas o partes de las plantas de control;

c) incubar las superficies heridas para permitir que se produzca decoloración en ellas o sobre ellas;

d) observar la decoloración de la superficie herida en o sobre las plantas o partes de las plantas;

5 e) comparar la decoloración de la superficie herida observada en o sobre las plantas o partes de las plantas que se van a escrutar con la decoloración que se observa sobre o en la planta o en la parte de la planta de control para identificar las plantas o partes de las plantas que no muestran decoloración o una decoloración que se reduce en comparación con la planta o parte de la planta de control.

10 Este método puede utilizarse para cualquier planta que pueda estar sujeta a decoloración, pero es útil en particular para producir, en particular hortalizas o frutas, o para flores. El método es entre otros adecuado para hortalizas de hoja, tales como lechuga, para tubérculos, como papa o batata, para raíces, tal como apio, para brotes, tal como endivia, o para hongos. Además, el método se puede utilizar para frutas, tales como manzana, plátano, aguacate, melocotón, pera, albaricoque, mango, berenjena y para flores o tallos de flores, tales como tallos de gerbera, flores de crisantemo, cogollo de alcachofa, etc.

15 El método de escrutinio está destinado a identificar plantas que tienen una decoloración superficial inducida por heridas reducida en una o más de sus partes o tejidos. Para el escrutinio, por lo tanto, es muy práctico utilizar la parte o el tejido que es propenso a la decoloración. En lechuga, esta puede ser la hoja o una parte de la misma, tal como un fragmento troquelado, en banana se puede utilizar adecuadamente rodajas de la fruta pelada y en flores, son un vehículo de ensayo muy práctico las rodajas del tallo.

20 El método es particularmente útil para seleccionar plantas que pertenecen a la familia *Asteraceae*, en particular las plantas del género *Lactuca* y más en particular a la especie *Lactuca sativa* o plantas pertenecientes al género *Cichorium* y en particular a las especies *Cichorium intybus* y *Cichorium endivia* que muestran una ausencia o reducción de la decoloración de la superficie inducida por heridas.

25 La población de plantas que se puede escrutar con el método puede ser cualquier población de plantas, pero es preferiblemente una población de plantas variable que tiene muchos miembros diferentes para aumentar las posibilidades de encontrar una planta que muestre una decoloración reducida inducida por heridas. Tal población variable se puede elaborar por medio de un tratamiento mutagénico utilizando, por ejemplo, productos químicos y/o irradiación, y se denomina en la presente memoria una población de plantas mutantes. Las poblaciones alternativas son colecciones de germoplasma, que son colecciones de plantas que muestran una variación natural. Además, se puede utilizar una población de plantas transgénicas.

30 El método se realiza adecuadamente con partes de plantas que tienen una superficie herida. Las muestras de ensayo muy útiles son discos que se troquelan de una hoja, los llamados discos de hoja. Alternativamente, se puede utilizar el tejido del nervio central de hortalizas de hojas nervadas. Los discos se cortan adecuadamente a partir de tales nervios.

35 La incubación tiene lugar adecuadamente en un entorno acuoso. El método se puede poner en práctica muy bien con discos de hoja que se incuban sobre o entre papel de filtro humedecido. La respuesta de decoloración es en ese caso muy visible alrededor de los bordes de la herida en el papel. En el caso de las plantas de los géneros *Lactuca* y *Cichorium* la decoloración es la respuesta de enrojecimiento.

40 Alternativamente, el entorno acuoso comprende agua o una solución. En un aspecto específico que se ilustrará adicionalmente a continuación, la solución contiene L-3,4-dihidroxifenilalanina. Este compuesto se convierte en la producción del pigmento negro melanina por la enzima polifenol oxidasa. Los compuestos alternativos que se pueden utilizar a este respecto incluyen, pero no se limitan a, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, L-tirosina y catecol.

45 La invención se refiere a una planta de lechuga mutante que tiene una modificación hereditaria inducida del genoma y que muestra una reducción de la respuesta de enrojecimiento y un hábito de crecimiento normal, en donde la modificación hereditaria, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal se encuentran en una planta de lechuga, cuya semilla representativa se depositó en NCIMB con el número de acceso 41454 o 41441, en donde la planta de lechuga mutante se puede obtener al cruzar dicha planta depositada con otra planta de la misma especie, y en donde la planta de lechuga mutante no se obtiene exclusivamente por un procedimiento esencialmente biológico.

50 La planta de la invención puede identificarse en el escrutinio y seleccionarse posteriormente por tener una decoloración de la superficie inducida por heridas reducida o ausente, pero posteriormente se somete a ensayo para determinar si tiene un hábito normal. Más en particular, la planta preferiblemente no debería mostrar efectos pleiotrópicos negativos.

55 De acuerdo con la invención, se identificaron y seleccionaron plantas que no muestran decoloración de la superficie inducida por heridas o muestran decoloración de la superficie inducida por heridas significativamente reducida. La progenie de las semillas de estas plantas se depositó en NCIMB y se le ha proporcionado el número de acceso como

se enumera en la Tabla 1. Los detalles sobre la descendencia de semillas de los depósitos se proporcionan en el Ejemplo 4 y en el Ejemplo 6. Estos depósitos se realizan porque tienen la característica específica única de que la decoloración inducida por heridas es nula o significativamente reducida. No se sometieron a ensayo los criterios DUS para el registro de la variedad, es decir, la susceptibilidad de distinción, la uniformidad, la estabilidad en todas las características de registro, y no se espera que cumplan con estos criterios de ninguna manera.

Tabla 1

Nº de planta	referencia interna (= referencia NCIMB)	número de acceso NCIMB	fecha de depósito
06D.210202	06D.863B2	41454	3 enero 2007
05D.202539	07G.9979	41441	10 octubre 2006

La invención describe adicionalmente plantas que tienen una decoloración superficial inducida por heridas reducida o ausente y que se pueden obtener al cruzar una planta de la invención con otra planta de la misma especie. La característica "decoloración de la superficie inducida por heridas reducida o ausente" se puede llevar por lo tanto a otras plantas que originalmente no tienen la característica. Se puede someter a prueba si las plantas resultantes de semejante cruce son en efecto plantas de la invención sometiendo estas plantas al método de escrutinio. Preferiblemente, las plantas que se seleccionan como plantas de la invención también se someten a ensayo a continuación para determinar que tienen un hábito normal.

La invención se refiere adicionalmente a la progenie de una planta progenitora de la invención, cuya progenie tiene la modificación del genoma hereditaria inducida, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal que se encuentra en la planta progenitora. Tal progenie puede estar separada del progenitor muchas generaciones. Siempre que se conserve la característica "decoloración de la superficie inducida por heridas reducida o ausente", la planta es una planta de la invención.

La invención se refiere adicionalmente a parte de la planta de la invención, cuya parte se selecciona en particular entre hoja, cabeza, tallo, brote, raíz, tubérculo, fruta, flor, semilla o trozos de las mismas, y células. Las partes de las plantas, como las cabezas o las hojas de lechuga, son normalmente las partes que tienen una superficie cortada que se puede someter a decoloración.

Las partes de las plantas de la invención se pueden utilizar en cultivo de tejidos para regenerar plantas que conservan la modificación hereditaria del genoma, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal que se encuentra en la planta de la que se deriva el tejido para el cultivo de tejido. Tales plantas regeneradas también son parte de esta invención.

La invención se refiere adicionalmente a la semilla de una planta de la invención, a partir de la cual se pueden cultivar plantas que tienen la modificación hereditaria inducida del genoma, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal de la invención. Se puede someter a prueba si las semillas, y por lo tanto las plantas desarrolladas a partir de las mismas, han conservado o no esa característica en el método de escrutinio de la invención. La invención también se refiere a generaciones adicionales de semillas que conservan la modificación hereditaria del genoma, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal que se encuentra en las semillas originales.

La invención es comercialmente muy interesante para el mercado de hortalizas procesadas. Como se explicó anteriormente, la decoloración del producto, en particular las frutas y hortalizas frescas, se considera no deseable ya que el producto decolorado es rechazado por el consumidor. La característica "decoloración de la superficie inducida por heridas reducida o ausente" de la invención se encuentra, por lo tanto, adecuada en los productos de hortalizas procesadas, como lechuga cortada, endivia o escarola o combinaciones de los mismos. Cuando se escrutan utilizando el método de la invención, las hortalizas procesadas de la invención muestran una decoloración foliar inducida por heridas nula o limitada. Todas las hortalizas procesadas, en particular la lechuga procesada, la endivia y la escarola que satisfacen el escrutinio son parte de la invención, ya que se demuestra que tienen una modificación que conduce a un flujo metabólico reducido dependiente de PAL y/o PPO.

Descripción detallada de la invención

Cuando la lechuga se cosecha y se procesa mediante corte, se generan muchas superficies heridas en la hoja lo que conduce a una respuesta significativa de la planta o partes de la planta, que se manifiesta por una decoloración parda o rosa en o adyacente a la superficie de la herida. El enrojecimiento también se puede observar en sitios distantes de la superficie de la herida en el nervio central de la hoja, así como en la parte basal. A veces, también se puede observar el enrojecimiento en fases inmediatamente anteriores a la cosecha, lo que se considera debido al estrés abiótico o a la excesiva maduración del cultivo.

Las diferentes formas de decoloración se llevan a cabo mediante actividad enzimática, que se potencia mucho como consecuencia de las heridas y que genera varias formas de polifenoles y productos de reacción derivados de los mismos.

5 Una actividad enzimática importante involucrada en la reacción de pardeamiento es la PPO. La actividad de la PPO en relación con el pardeamiento enzimático no se limita a la lechuga, pero se ha descrito para muchas otras especies de plantas que están involucradas en el deterioro posterior a la cosecha, como en la manzana, el plátano y la patata. De hecho, la PPO es ampliamente reconocida como una de las enzimas más importantes involucradas en el deterioro posterior a la cosecha de muchas frutas y hortalizas frescas procesadas.

10 Por esta razón, la PPO ha sido el objetivo de muchas tecnologías, que apuntan a la reducción o prevención de su actividad para aumentar la calidad de los productos alimenticios después de la cosecha. La PPO cataliza una reacción en la que los polifenoles que residen en el tejido vegetal se oxidan para dar lugar a la formación de o-quinonas. Posteriormente, las reacciones enzimáticas y no enzimáticas conducen a la formación de pigmentos marrones o negros.

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

El sustrato natural de PPO puede diferir entre las diferentes especies. En la lechuga, los derivados del ácido cafeico como el ácido clorogénico y el ácido isoclorogénico actúan principalmente como sustrato de PPO.

20 El nivel de la enzima PPO no se induce específicamente al herir tejidos vegetales, pero reside inactivamente en el cloroplasto. Tras la herida, se activa la PPO, que se manifiesta debido al hecho de que el sustrato fenólico que reside en las vacuolas se pone en contacto con la PPO debido a la rotura del tejido.

25 En la lechuga, la producción de polifenoles, que son el sustrato de PPO, se induce después de la herida. Por lo tanto, el potencial de pardeamiento del tejido de lechuga no parece estar limitado por la cantidad de PPO en el tejido de la hoja sino por la tasa de biosíntesis de polifenoles después de la herida.

En este sentido la situación puede diferir entre cultivos. Por ejemplo, en la manzana, la cantidad de polifenoles es suficiente para generar una respuesta de pardeamiento de las frutas en el plazo de una hora después de la herida, mientras que en lechuga la reacción de pardeamiento puede llevar unos días debido al hecho de que en lechuga es necesario en gran medida que la agrupación de polifenoles se sintetice *de novo* después de la herida.

30 La síntesis de polifenoles se produce a través de una ruta bioquímica bien caracterizada llamada vía fenilpropanoide. La primera etapa comprometida de esta vía es catalizada por la enzima fenilalanina amoniaco liasa (PAL, Hahlbrock, K y Scheel, D (1989) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol. 40, 347-369). La PAL convierte el aminoácido fenilalanina sintetizado a través de la vía shikimato en ácido cinámico.

35 En la lechuga, la herida de las hojas conduce a una fuerte inducción de la expresión del gen PAL y la actividad PAL. La formación de polifenoles se correlaciona con esta actividad enzimática, lo que sugiere que la actividad PAL inducida por heridas de la lechuga es un factor importante responsable del pardeamiento (Campos, R. et al. (2004) *Physiologica Plantarum* 121, 429-438 y referencias del mismo). Sin embargo, actualmente no está claro qué otros factores determinan el resultado final de la reacción de decoloración inducida por heridas. Por ejemplo, se ha sugerido que la actividad de las peroxidasas (POD) también es importante para establecer el nivel final de decoloración (Fukumoto, L.R. et al. (2002) *J. Agric. Food Chem.* 50, 4503-4511; Martin-Diana A. et al (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1677-1685).

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

45 Es evidente, adicionalmente que la planta percibe las heridas de alguna manera y, posteriormente, se genera una señal a través de una cascada, que actualmente está pobremente definida para la lechuga. Parece obvio que estas actividades se dirigirán principalmente hacia la curación de heridas y la defensa contra patógenos. Por lo tanto, es probable que muchos factores genéticos estén involucrados en el aumento de la respuesta de decoloración del tejido de lechuga herido y cada uno de estos son objetivos potenciales para la modificación genética para reducir o eliminar la decoloración inducida por heridas.

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

55 Por ejemplo, aunque se considera que la actividad PAL inducida por heridas determina el nivel de pardeamiento de la lechuga, se sabe que los productos de la vía fenilpropanoide están involucrados en entre otros en la biosíntesis de la pared celular o también en la respuesta de defensa. Por lo tanto, reducir la actividad PAL inducida por heridas para

reducir el potencial de pardeamiento puede comprometer otras funciones además del pardeamiento inducido por heridas, que puede ser menos deseable en relación con otros aspectos del cultivo de lechuga.

Del mismo modo, se ha insinuado que la actividad de PPO está implicada en la respuesta de defensa y, por lo tanto, en reducción del potencial de pardeamiento mediante reducción de los niveles de PPO puede aumentar la susceptibilidad a patógenos (Thipyapong, P. et al (2004) Planta 220, 105-117). Por lo tanto, los autores de la presente invención razonaron que un enfoque más imparcial podría ser más exitoso a este respecto. Tal enfoque comprende las siguientes etapas:

1. Generar una población variante de plantas, en particular una población mutante. Tal población mutante puede generarse mediante el tratamiento de semillas o tejidos vegetales con agentes mutagénicos como el metil sulfonato de etilo (ems) o los rayos X.

2. Configurar un escrutinio fenotípico eficaz cuya selección se basa en una decoloración de la planta inducida por la respuesta de la herida, en particular una hortaliza de hoja, más en particular lechuga, endivia o escarola, que se canaliza a través de PAL y/o PPO.

3. Caracterizar los mutantes modificados en su respuesta a la herida con respecto al potencial de decoloración posterior a la cosecha y ausencia de efectos pleiotrópicos de la modificación, que comprometen el crecimiento y el procesamiento de la planta, en particular una hortaliza de hoja, más en particular lechuga, endivia o escarola de acuerdo con la práctica común.

Por lo tanto, la invención describe un método de escrutinio sin sesgo para identificar, seleccionar y obtener una planta que muestre una decoloración reducida inducida por heridas y trastornos de procesamiento posteriores a la cosecha, tales como pardeamiento o enrojecimiento enzimáticos.

La invención también describe un método más sesgado que utiliza un sustrato que es convertido en un pigmento por la PPO. En este ensayo, el escrutinio es específicamente para mutantes PPO. Un sustrato adecuado es L-DOPA que se convierte en el pigmento negro melanina.

El método se ilustra en la presente memoria refiriéndose a hortalizas de hoja, como la lechuga, pero también se puede poner en práctica de la misma manera con otras plantas como se indicó anteriormente.

Una población de plantas mutantes para su uso en el método se puede preparar, por ejemplo, de la siguiente manera:

- a) tratar las semillas M0 de una especie de planta a modificar con un agente mutagénico para obtener semillas M1;
- b) cultivar plantas a partir de las semillas M1 obtenidas de este modo para obtener plantas M1;
- c) opcionalmente repetir las etapas b) y c) n veces para obtener semillas M1 + n;
- d) hacer germinar las semillas M1 + n así obtenidas, haciendo crecer las plantas a partir de esas semillas.

Estas plantas se someten posteriormente a ensayo para su respuesta a la de decoloración inducida por heridas. Se seleccionan las plantas que no muestran o muestran una respuesta de decoloración reducida a las heridas. Después, la progenie de las plantas seleccionadas se cultiva y se mide la respuesta de decoloración inducida por heridas.

Para crear variabilidad genética se puede hacer uso de la mutagénesis. El experto en la técnica conoce varios productos químicos o tratamientos físicos que pueden utilizarse para inducir mutaciones genéticas en especies de plantas como la lechuga. Por ejemplo, un experto en la técnica puede tratar semillas de lechuga en una solución que contenga diferentes concentraciones de un mutágeno como ems. Los alquilatos de ems principalmente los residuos G de una cadena de ADN, que durante la replicación del ADN causa el emparejamiento con T en lugar de C. Por lo tanto, los pares de bases GC cambian a pares de bases AT a una frecuencia, que está determinada por la dosis eficaz de ems y la actividad del sistema de reparación de la planta se desajusta.

La dosis eficaz de ems depende de la concentración utilizada, el tamaño de la semilla y otras propiedades físicas y el tiempo de incubación de las semillas en la solución de ems. Las semillas, que han sido tratadas con ems, generalmente se llaman semillas M1. Como consecuencia del tratamiento, los tejidos de las semillas M1 contienen mutaciones puntuales al azar en los genomas de sus células y aquellos presentes en la subpoblación de células, que formarán el tejido de la línea germinal (células germinales) se transferirán a la siguiente generación que se llama M2. Las mutaciones o combinaciones de las mismas que sean haplo-insuficientes causando así la esterilidad o que induzcan letalidad embrionaria no se transferirán a la generación M2.

Un procedimiento similar al descrito anteriormente para el uso de ems se aplica también a otros agentes mutagénicos. Los agentes mutagénicos adecuados son bien conocidos en la técnica. Son particularmente útiles los agentes mutagénicos alquilantes, tales como dietil sulfato (des), etilenimina (ei), propano sulfato, N-metil-N-nitrosouretano (mnu), N-nitroso-N-metilurea (NMU), N-etil-N-nitrosourea (enu), azida de sodio.

Alternativamente, las mutaciones se inducen por medio de irradiación, que se selecciona, por ejemplo, entre rayos X,

neutrones rápidos e irradiación UV.

Las mutaciones también pueden inducirse por medio de ingeniería genética, tal como por medio del uso de oligonucleótidos quiméricos, la recombinación homóloga, la selección de genes, la introducción de genes diana modificados, que compiten con el producto endógeno, la regulación negativa mediante la interferencia de ARN, etc.

5 La población M2 de un tratamiento de mutagénesis se puede utilizar en procedimientos de escrutinio dirigidos a la respuesta de la herida, que se canaliza a través de PAL y PPO. Es obvio para el para el experto en la técnica que cualquier población de plantas, que porte una variación genética, puede tomarse como material de partida para tal análisis fenotípico.

10 Preferiblemente, el método se refiere adicionalmente a alelos piramidales que causan una respuesta reducida a la decoloración inducida por heridas.

La producción de semillas M1 y M1 + n se efectúa adecuadamente por medio de autopolinización.

La invención describe adicionalmente la obtención de plantas o partes de plantas con genotipos alterados, cuyas plantas o partes de plantas muestran una susceptibilidad reducida frente a trastornos fisiológicos del procesamiento posterior a la cosecha, tales como pardeamiento o enrojecimiento enzimáticos.

15 La invención se refiere a plantas o partes de plantas, que tienen en su genoma información genética que es responsable de la susceptibilidad reducida a los trastornos del procesamiento posterior a la cosecha, tales como el pardeamiento o enrojecimiento enzimáticos, y se encuentra en el genoma de una planta de lechuga.

20 La progenie de las plantas reivindicadas también forma parte de esta invención. Se pretende que "Progenie", como se emplea en la presente memoria, abarque todas las plantas que tienen la misma susceptibilidad reducida o una susceptibilidad similarmente reducida a los trastornos del procesamiento posterior a la cosecha, en particular el pardeamiento o enrojecimiento enzimáticos, que las plantas originales descritas en la presente memoria y que derivan de ellas de cualquier manera, tal como mediante reproducción sexual, como la autofertilización o fertilización cruzada con otra planta del mismo género, o reproducción vegetativa tal como corte, cultivo de tejidos, cultivo haploide, cultivo de protoplastos, fusión de protoplastos u otras técnicas. Tal progenie no es solo la primera generación de plantas derivadas mediante una o más de estas técnicas, sino también cada generación adicional de plantas derivadas mediante una o más de estas técnicas, siempre que las plantas derivadas tengan la susceptibilidad reducida.

25 Para llevar a cabo el escrutinio fenotípico, se debe generar una superficie de la herida ya que la reacción de decoloración enzimática se induce después de la herida. Herir es la perturbación irreversible de la estructura natural de la planta, tejido y/o célula por métodos como corte, picado, rebanado, abrasión, aplastado, rotura, pelado, triturado, prensado, recortado, molido, inyección de fluidos, choque osmótico, desprendimiento, segado, fragmentación, frotamiento y desgarro.

30 Posteriormente, se debe manifestar una característica fenotípica que es diagnóstica de la vía que conduce a la decoloración del tejido y que se puede utilizar de manera muy eficaz en un escrutinio de la población mutante.

35 Se descubrió sorprendentemente que tales características fenotípicas se pueden obtener tomando partes de hojas de plantas de lechuga e incubándolas en condiciones muy específicas que favorecen la aparición de diferentes formas de decoloración de la superficie de la herida. Posteriormente, tales ensayos pueden aplicarse a grandes cantidades de plantas mutantes para seleccionar aquellas plantas que muestran una reducción de la respuesta de decoloración inducida por heridas.

40 Un aspecto de este método se basa en el sorprendente hallazgo de que cuando se toman discos de hoja, en particular de hojas de lechuga, se incuban entre papeles de filtro humedecidos a 5°C, después de aproximadamente 4 días, resulta evidente la formación de un colorante rosado en los bordes de los discos de hoja. El papel de filtro adecuado es papel de filtro de tipo 1450 CV, Ref.núm. 10 313 281 de Schleier & Schuell, Microscience GmbH, Dassel, Alemania. Tras una incubación adicional, la señal se intensifica y después de aproximadamente una semana se alcanza la intensidad máxima. La formación del colorante rosado se produce específicamente en las superficies de la herida.

45 La decoloración se puede medir puntuando en una escala visual de 0, lo que significa que no hay ni pardeamiento ni enrojecimiento a 10, lo que significa que se produce pardeamiento y enrojecimiento como en una variedad de lechuga convencional (*L. sativa*). En el presente ejemplo la variedad de *L. sativa* 'Troubadour' se utiliza como un patrón de 10. Si se desea, las imágenes se pueden utilizar para comparar y calificar las clases intermedias entre 0 y 10. Además, se pueden elaborar imágenes digitales del papel de filtro con el colorante rosado, seguidas de conteo por posición de disco de hoja del número de píxeles con un color rosado intenso. Utilizando una de estas mediciones, se pueden realizar análisis estadísticos simples como un ensayo t, bien conocido por los expertos en la técnica, para establecer si una planta o grupo de plantas es significativamente menos rosado que el convencional, como el cv 'Troubadour'. El nivel de significación aplicado de una prueba unilateral es 0,001.

55 Para los mutantes, la comparación estadística se puede hacer entre las puntuaciones de enrojecimiento de la variedad original, que es el mejor patrón disponible, y las puntuaciones de enrojecimiento de los mutantes individuales y/o sus

vástagos.

Para encontrar el rasgo de la invención en plantas existentes, se pueden utilizar muestras representativas de variedades, líneas de reproducción y/o accesos de bancos de genes. La comparación estadística se puede hacer entonces entre las puntuaciones de enrojecimiento del acceso individual bajo investigación y el resto de la población.

5 Cuando se someten a ensayo estadísticamente los individuos estadísticos para determinar un enrojecimiento significativamente menor pueden ser necesarias múltiples pruebas de comparación para mantener niveles de significación generales adecuados, por ejemplo, la prueba de comparación múltiple de Dunnett con un patrón (Dunnett CW, J. Amer. Estadístico. Asoc. 50: 1096-1121 (1955)).

10 Adicionalmente, se demostró que la respuesta de decoloración inducida por heridas se puede obtener utilizando muchos tipos diferentes de tejido de hojas de diferentes etapas de desarrollo. Por ejemplo, también se puede inducir el tejido del nervio central para que dé esta respuesta después de la herida. Cuando se aplicaron a diferentes tipos de lechugas, tales como mantecosa, iceberg, cos, batavia o hoja de roble, no se encontraron accesos individuales que mostraran significativamente menos enrojecimiento que el resto de la población investigada.

15 Se demostró adicionalmente que un inhibidor específico de la PPO, la L-cisteína, cuando se aplicaba durante la reacción, suprimía enérgicamente la formación del colorante rosado. Además, se descubrió que la formación del colorante rosado fue inhibida por el cinamaldehído, que es un inhibidor de la actividad PAL y el pardeamiento de la lechuga recién cortada (Fujita, N. et al (2006) Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 672-676). Estos hallazgos muestran que la respuesta de decoloración rosada de la lechuga es dependiente de PAL y PPO.

20 Se sabe que el pardeamiento enzimático de lechuga recién cortada se evita de manera muy eficaz mediante la aplicación de un breve choque térmico. El efecto observado se puede explicar asumiendo que el re-direccionamiento de la biosíntesis de proteínas de la ruta del fenilpropanoide a las proteínas de choque térmico reduce el flujo metabólico hacia la formación de polifenoles.

25 Alternativamente, el efecto puede explicarse suponiendo que las enzimas involucradas en la oxidación de polifenoles, tales como la PPO y la POD, se inactivan por el tratamiento de choque térmico. Cuando se aplicó el choque térmico a la lechuga, que posteriormente se sometió a ensayo para determinar la respuesta de enrojecimiento, se demostró que esta respuesta, como el pardeamiento enzimático, se inhibió de manera eficaz. Esto demuestra que la respuesta de enrojecimiento de la lechuga es fisiológicamente muy similar a la bien conocida respuesta de pardeamiento enzimático.

30 Este hallazgo se confirmó adicionalmente mediante la aplicación de L-cisteína como agente reductor. También se sabe que la L-cisteína, además de ser un inhibidor de la PPO, reacciona con o-quinonas coloreadas y las convierte de nuevo en difenoles incoloros en una reacción de reducción química. Cuando el colorante rosado formado por los discos de hoja de lechuga se trataba con L-cisteína, se demostró que el compuesto rosado se convirtió en un compuesto incoloro. Por lo tanto, parece probable que el colorante rosado sea una o-quinona formada por PPO.

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

35 Además, cuando las plantas, que se toman del campo, que muestran enrojecimiento se tratan con L-cisteína, la decoloración rosada también se elimina. Esto demuestra que la respuesta de enrojecimiento del disco de hoja representa el fenómeno natural del enrojecimiento, que a veces se puede ver en plantas que crecen en condiciones de campo.

40 Un aspecto adicional de este método se basa en el siguiente experimento. Las partes de una hoja de lechuga de una cabeza se producen cortando e incubando a 16°C en aire. Como respuesta, la superficie de la herida se vuelve parda después de aproximadamente 4 días. Especialmente en la superficie de la herida del nervio principal se puede observar claramente el pardeamiento. Además, la reacción de pardeamiento también se puede observar a nivel de toda la planta tras lesionar las hojas por corte o abrasión.

45 Todas estas reacciones de pardeamiento se pueden inhibir completamente con la L-cisteína, un inhibidor de la PPO, que demuestra que estos fenotipos se manifiestan a través de la actividad de la PPO y, por lo tanto, pueden considerarse diagnósticos para el pardeamiento posterior a la cosecha, tal como se observó durante el procesamiento y envasado de la lechuga.

50 Estas reacciones de pardeamiento inducidas por heridas pueden generarse de una manera eficaz que puede explotarse en un procedimiento de escrutinio fenotípico para identificar plantas mutantes que tienen un potencial de pardeamiento inducido por heridas reducido.

Un aspecto adicional de este método se basa en la decoloración en las superficies de la herida de los tejidos de lechuga inducida mediante la aplicación de sustratos que se pueden convertir por la acción de las enzimas oxidantes de fenol en compuestos coloreados.

55 Por ejemplo, cuando los discos de hoja de lechuga se incuban con el sustrato de PPO L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), se observa una decoloración de pardo oscuro a negro en la superficie de la herida, que es la manifestación

de la formación de melanina a través de la PPO. Cuando se aplicó L-cisteína simultáneamente, la decoloración negra se inhibió completamente, lo que confirma el supuesto de que esta decoloración está mediada por la PPO.

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

- 5 De manera similar a la descrita para L-DOPA, se pueden aplicar otros sustratos para provocar una respuesta de decoloración. Estos incluyen, pero no se limitan a, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, L-tirosina y catecol.

10 En conjunto, la formación de los diferentes colorantes en las superficies de la herida generadas en las plantas escruta las modificaciones en una ruta que comienza por la inducción de una señal de la herida, canalizada a través de PAL y PPO y que conduce a la decoloración. Como se describe, estas reacciones de decoloración inducidas por heridas pueden evaluarse fácilmente mediante una inspección visual que permite un procedimiento de escrutinio de mutantes muy eficaz. La razón subyacente del método se ilustra en la Figura 1.

15 Por lo tanto, se descubrió que la ruta de decoloración inducida por heridas de los discos de hoja in vitro en gran parte se superpone con la decoloración inducida por heridas de lechuga procesada a escala industrial y, por lo tanto, puede considerarse diagnóstica para este procedimiento. Esto se ve corroborado por la idea de que los inhibidores de PAL o PPO inhiben el pardeamiento enzimático de lechuga procesada y envasada en condiciones prácticas e industriales. Es importante destacar que, como el procedimiento comprende la etapa de inducción, es decir, la lesión y una de las conversiones metabólicas finales mediadas por la PPO, el procedimiento permite capturar todos los factores genéticos involucrados directa o indirectamente en este proceso fisiológico. Además, como esta respuesta puede generarse utilizando una gama completa de tejidos foliares de hojas de diferentes fases de desarrollo, los escrutinios de mutantes pueden dirigirse hacia estas diferentes fases o tejidos cuando se consideran relevantes.

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

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

30 En el caso de mutaciones recesivas, estas dos posibilidades se pueden distinguir fácilmente mediante la realización de ensayos de alelismo, que comprenden el cruce de las dos plantas mutantes y la determinación del fenotipo del híbrido. En el caso de alelismo de las mutaciones, el rasgo de decoloración reducida será evidente en la F1, mientras que en caso de que el fenotipo en los mutantes esté determinado por diferentes loci recesivos, este no será el caso.

35 Como la mutagénesis aleatoria se aplicó para generar la población inicial, las mutaciones en el antecedente genético también pueden contribuir a la variación del fenotipo bajo condiciones experimentales. Para discriminar entre mutaciones únicas de diferentes intensidades y un efecto combinado de mutaciones en el antecedente genético, se deben realizar retrocruzamientos para crear antecedentes genéticos uniformes para los diferentes eventos de decoloración reducida.

Tal procedimiento es adicionalmente relevante para determinar si las mutaciones en loci específicos involucrados en la decoloración inducida por heridas muestran efectos pleiotrópicos.

40 Las plantas M2 así seleccionadas en base a una respuesta de decoloración reducida se utilizan para cultivar semillas M3. Posteriormente, las líneas puras que descienden de los eventos de decoloración reducida se vuelven a evaluar para su respuesta reducida a la herida. Además, el pardeamiento o enrojecimiento reducido se puede evaluar en diferentes antecedentes genéticos y en diferentes condiciones de cultivo y procesamiento.

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

50 Aunque la mutagénesis inducida es el método preferido para utilizar en esta invención, el experto en la técnica sabe que existe una tecnología que permite modificar las dianas de genes que residen en el genoma de una planta de una manera específica. Por ejemplo, se ha demostrado que los oligonucleótidos quiméricos son mutágenos eficaces con un modo de acción específico.

55 Otro enfoque es modificar las dianas genéticas a través de la recombinación homóloga o la diana génica. Utilizando tal enfoque, se intercambia un fragmento de un gen por un fragmento de ADN introducido que contiene una modificación deseada. También son factibles los enfoques transgénicos en los que se introducen genes diana modificados que compiten con el producto endógeno. Esto puede llevar a efectos negativos dominantes. Además, la

regulación negativa específica de la expresión de los genes es factible a través de la interferencia de ARN.

En el caso de oligonucleótidos mutagénicos, la orientación de genes o los enfoques transgénicos se utilizan para modificar un factor genético involucrado en la respuesta de decoloración inducida por heridas, obviamente, la estructura primaria de los genes relevantes debe ser conocida.

5 Los mutantes de la lechuga y la progenie derivada de la misma de la invención se pueden identificar en base a la decoloración rosada inducida por heridas de los discos de hoja de lechuga. La aplicación de este ensayo de enrojecimiento a plantas de una población M2 que contienen mutaciones aleatorias inducidas por EMS dio como resultado la identificación de varios mutantes, que mostraron una reducción significativa de la respuesta de enrojecimiento en comparación con las plantas de control, que no contienen mutaciones inducidas por EMS.

10 La mayoría de tales mutantes mostraron un fenotipo enano y, a menudo, clorótico. Sin embargo, se encontró sorprendentemente que algunos mutantes con una respuesta de enrojecimiento reducida mostraron un hábito de crecimiento normal, es decir, un tamaño, forma, crecimiento y color muy similar al de las plantas de control.

15 Cuando las plantas de la progenie de este mutante particular cultivadas a partir de semillas obtenidas a través de la autofecundación se someten a ensayo para determinar el enrojecimiento, se observa una reducción similar a la del mutante identificado originalmente. Esto demuestra que una respuesta de decoloración rosada reducida puede ser hereditaria y causada por una modificación del genoma.

Un hallazgo sorprendente adicional fue el hecho de que cuando las plantas de la progenie se cultivaban hasta la madurez y se sometían a prueba para determinar el pardeamiento enzimático del tejido del nervio central herido, esta respuesta también resultaba fuertemente inhibida.

20 Esto muestra que el ensayo de enrojecimiento del disco de hoja, que es parte de esta invención, está relacionado causalmente con el pardeamiento enzimático en lechuga y que el ensayo de enrojecimiento se puede utilizar para predecir el nivel de pardeamiento enzimático de una planta de lechuga madura.

25 Por lo tanto, el ensayo de enrojecimiento del disco de hoja se puede utilizar como una herramienta de selección para identificar plantas de lechuga con un potencial de pardeamiento enzimático reducido. Tal herramienta se puede utilizar para identificar plantas de lechuga con un potencial de pardeamiento enzimático reducido de cualquier tipo de población de plantas, independientemente de la causa de la variación genética, que reside en tal población. Por ejemplo, además de las poblaciones de EMS, se pueden utilizar accesos naturales o poblaciones reproductoras.

30 Uno o más de los métodos de escrutinio descritos en la presente memoria pueden aplicarse a cualquier especie de hortaliza de hoja para la cual la calidad del procesamiento posterior a la cosecha necesite mejoras. Por lo tanto, este método se puede aplicar también, además de la lechuga cultivada, a otras especies de plantas que pertenecen a *Asteraceae*, tales como especies silvestres del género *Lactuca*. Además, el método puede aplicarse en particular a especies de plantas que pertenecen al género de plantas *Cichorium* al que pertenecen especies como la endibia (*Cichorium endivia*), achicoria y escarola (*Cichorium intybus*).

35 La presente invención describe una característica fenotípica que puede detectarse en una planta mediante la realización de uno de los métodos de escrutinio que se describen en la presente memoria. Las plantas de la invención son aquellas plantas que, en comparación con una planta de control, muestran la ausencia o reducción de la decoloración de la superficie inducida por heridas. La presencia de la característica se determina por medio de una o más de tres pruebas de decoloración, a saber, la aparición de enrojecimiento o pardeamiento o la capacidad de convertir el sustrato L-DOPA en melanina. Una planta de la invención es una planta, que en al menos una de estas pruebas muestra una decoloración que se reduce al menos en comparación con un control.

40 El "control" como se emplea en la presente memoria es cualquier planta de la que se sabe que muestra una o más de las reacciones de decoloración enrojecimiento, pardeamiento y de conversión de L-DOPA en melanina, cuyas reacciones pueden ser inhibidas por L-cisteína o cinamaldehído. Adecuadamente, se utiliza una planta de la cual, cuando se incuba un disco de hoja entre papel de filtro humedecido a 5°C durante 7 días, muestra decoloración rosada alrededor de los bordes del disco.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los ejemplos que siguen y que no se pretende que limiten la invención de ninguna manera. En los ejemplos se hace referencia a las siguientes figuras.

50 Figura 1: Resumen esquemático de las razones detrás del diseño del procedimiento de escrutinio de mutantes de poblaciones de lechuga para determinar la decoloración enzimática reducida posterior a la cosecha. La señal de entrada del escrutinio es la herida del tejido de la hoja, que es detectada por la planta y que genera una respuesta de señalización divergente que conduce a una serie de procesos fisiológicos que incluyen senescencia, respiración y decoloración del tejido. Esta señal de entrada se puede combinar con la aplicación de compuestos fenólicos como sustratos de PPO. La señal de salida del escrutinio es una decoloración parda o rosada, dependiendo de las condiciones aplicadas, del diagnóstico de la superficie de la herida para el pardeamiento y el enrojecimiento posteriores a la cosecha. Esto se deduce del hecho de que la señal de salida está completamente inhibida por el cinamaldehído y la L-cisteína, que son inhibidores específicos de PAL y PPO, respectivamente.

Figura 2: Imagen representativa del fenotipo de salida del escrutinio basada en la decoloración rosada de los discos de hoja. Los discos de hoja de plantas de lechuga (1 disco por planta) se colocan entre papeles de filtro humedecidos y se incuban a 5EC durante 7 días. Se puede observar claramente una decoloración rosada alrededor de cada disco de hoja en la superficie de la herida.

5 Figura 3: El ensayo de enrojecimiento del disco de hoja (4 discos por placa) se llevó a cabo en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de PAL cinamaldehído. El número sobre cada placa muestra el % de cinamaldehído utilizado.

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

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

Figura 6: El efecto del pre-tratamiento de choque térmico sobre el enrojecimiento del disco de la hoja de lechuga. El choque térmico se aplicó durante 90 segundos en hojas intactas a la temperatura indicada en cada placa.

Figura 7: Conversión del colorante rosado formado por la respuesta de la herida de lechuga a un compuesto incoloro por L-cisteína. La fila superior de placas muestra el ensayo de L-DOPA, mientras que la fila inferior de placas muestra el ensayo de enrojecimiento. La parte inferior de los dos discos en cada placa se trató con L-cisteína después de que se hubiera completado la respuesta de la herida. Las concentraciones de L-cisteína utilizada son 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 mM, que se indica anteriormente.

Figura 8: Reducción del enrojecimiento en lechuga cultivada en campo por L-cisteína. El panel superior muestra los síntomas típicos del enrojecimiento de una hoja de lechuga tomada de una planta, que estaba extremadamente estresada por el encharcamiento en agua. Los nervios principales muestran la presencia de un colorante rosado. El panel inferior derecho muestra un disco tomado de la hoja que muestra síntomas de enrojecimiento después del tratamiento con L-cisteína 1 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. El panel inferior izquierdo muestra un disco de hoja similar después del tratamiento con agua durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Figura 9: Panel A: Análisis fenotípico de plantas M2 de lechuga individuales (agrupadas en agrupaciones) para la decoloración del disco de hoja de acuerdo con el método descrito por esta invención. En este panel se muestra un total de 138 muestras de 12000, de las cuales la indicada por una flecha mostró una decoloración por enrojecimiento fuertemente reducida. Panel B: la repetición de la prueba del individuo seleccionado indicado en el panel A confirmó la casi ausencia de formación de la decoloración rosada (muestra en la posición media) en comparación con las muestras de control que muestran una respuesta clara de decoloración.

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

Figura 11: Pruebas de progenie de un mutante de lechuga que muestra una decoloración reducida. A la izquierda, se muestran 25 muestras de control que muestran una respuesta de decoloración inducida por heridas normal. A la derecha, se muestra un grupo de muestras que se toma de una serie de 35 plantas de progenie derivadas de un solo mutante, que tiene una respuesta de decoloración inducida por heridas gravemente reducida.

Figura 12: Imagen representativa del fenotipo de salida del escrutinio basada en la decoloración parda de las partes del nervio central de las hojas tomadas de plantas de lechuga maduras. La imagen muestra discos de tejido del nervio central de la hoja externa de la lechuga después de la incubación durante 3 días a 16EC. La decoloración parda típica se puede observar claramente en la superficie de la herida. Cada placa contiene 3 discos tomados en diferentes posiciones del nervio central (de color verde, verde claro y blanco). El número sobre la placa indica la concentración mM de L-cisteína que se había añadido al filtro.

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

Figura 14: Pruebas de progenie de un mutante de lechuga que muestra una decoloración rosada inducida por heridas reducida en el pardeamiento del nervio central. El panel A muestra los discos de nervio central de 8 plantas de la progenie, numerados del 1 al 8 (3 discos por planta) del mutante de enrojecimiento reducido. El panel B muestra los discos de nervio central de 8 plantas de control numeradas de 9 a 16 (3 discos por planta) que muestran una respuesta

de pardeamiento normal.

Figura 15: Evaluación de un mutante de lechuga que muestra una reducción de la decoloración rosada o una respuesta al pardeamiento inducidas por heridas después del corte y el envasado en atmósfera ambiente. Los pedazos de hojas de la cabeza de una planta de control se muestran a la izquierda y los pedazos de hojas del mutante de decoloración reducida se muestran a la derecha. El material recién cortado de la hoja se almacenó durante 6 días a 4EC. La decoloración parda se puede observar claramente en las muestras de control, mientras que las muestras mutantes permanecen sin cambios.

Ejemplos

Ejemplo 1

10 Modificación genética de lechuga utilizando ems.

Se incubaron aproximadamente 2000 semillas de las variedades de lechuga Troubadour, Apache, Yorvik y Roderick en una solución aireada de ems al 0,05% (p/v) o 0,07% (p/v) durante 24 horas a temperatura ambiente. Después del tratamiento con ems, las semillas M1 se enjuagaron con agua y se plantaron en un invernadero a 20°C a 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad para cultivar las plantas maduras e inducir el florecimiento y la floración para producir semillas M2. Después de la maduración, las semillas M2 se recolectaron, se agruparon y se almacenaron hasta su uso posterior. La frecuencia de mutación se estimó sobre la base del número relativo de plantas individuales con un fenotipo blanqueado que presentan una alteración en la biosíntesis de la clorofila.

Ejemplo 2

20 Desarrollo de un diagnóstico de escrutinio fenotípico para la decoloración de lechuga inducida por heridas basada en la formación de pigmento rosado

Se desarrolló un ensayo fenotípico en el que se puede evaluar fácilmente la decoloración de la hoja de lechuga inducida por heridas. Este enfoque permite el escrutinio de plantas jóvenes para determinar la decoloración. Se tomaron discos de hoja de 5 mm de diámetro de plantas jóvenes o maduras y se colocaron entre papeles de filtro humedecidos en una bandeja. El sistema se incubó a 5°C durante 7 días. Durante la incubación, se desarrolló un colorante rosado en el sitio de la herida del disco de hoja que se hizo claramente visible como un círculo impreso en el papel de filtro (Figura 2).

Con el fin de demostrar que la producción del colorante rosado requiere una ruta activa fenilpropanoide, se sometió a prueba en este ensayo el efecto de los inhibidores de PAL (cinamaldehído, Figura 3) y PPO (L-cisteína, Figura 4). Cuando se aplicó cinamaldehído durante el ensayo, la decoloración rosada se inhibió completamente a una concentración de 0,01% o mayor.

Se obtuvo un resultado similar utilizando L-cisteína a una concentración de 0,001% y mayor, mientras que otros aminoácidos como L-leucina o L-alanina no mostraron ningún efecto. Esto demuestra que la L-cisteína puede inhibir la respuesta de enrojecimiento de los discos de hoja de lechuga y que el efecto inhibitorio de la L-cisteína es específico.

35 Para demostrar que la L-cisteína actúa de hecho como un inhibidor de la actividad de la PPO en este sistema, los discos de hoja de lechuga se incubaron con el sustrato de PPO L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Aunque la L-DOPA no se considera un sustrato natural para la PPO de lechuga, se observó una decoloración de color pardo oscuro a negro en la superficie de la herida, que es la manifestación de la formación de melanina a través de la PPO. Cuando se aplicó una concentración de L-cisteína 1 mM o mayor simultáneamente, la decoloración se inhibió completamente como se muestra en la Figura 5.

40 La respuesta de enrojecimiento del disco de hoja de lechuga se caracterizó adicionalmente por la aplicación de un choque térmico antes de inducir la respuesta de la herida. Las hojas separadas se incubaron durante 90 segundos a 21, 40, 50 y 60°C. Después de este tratamiento, se tomaron discos de hoja y se sometieron a ensayo para determinar el enrojecimiento. La respuesta de enrojecimiento se inhibió completamente cuando el choque térmico se llevó a cabo a una temperatura de 50°C o mayor. Este resultado se muestra en la Figura 6.

45 Como se sabe que la L-cisteína reacciona con las o-quinonas, que son productos de la PPO, al convertirlas de nuevo en difenoles incoloros, se determinaron los efectos de la L-cisteína sobre el colorante rosado proveniente de los discos de hoja de lechuga. En paralelo, se determinó el efecto de la L-cisteína sobre la formación de melanina tras la incubación con L-DOPA.

50 Los discos de hoja se tomaron e incubaron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. Una vez completada la respuesta de la herida, se añadieron series de concentración de L-cisteína al disco de hoja y se controló el cambio de color. El resultado se muestra en la Figura 7. El experimento demostró claramente que la L-cisteína estaba convirtiendo el colorante rosado nuevamente en un compuesto incoloro, mientras que la melanina negra formada en el ensayo de L-DOPA no se vio afectada por la L-cisteína. Esto demuestra que el colorante rosado es muy probablemente una o-quinona que está formada por el sistema de oxidación de polifenol de lechuga.

Se aplicó decoloración basada en L-cisteína a material vegetal cultivado en el campo para demostrar que los reflejos de respuesta *in vitro* observados son fisiológicamente relevantes. Esto se llevó a cabo mediante la recolección de una hoja de una planta de lechuga cultivada en el campo que mostraba síntomas severos de enrojecimiento a lo largo de los nervios. Esto se observa normalmente cuando las plantas se han estresado, por ejemplo, por condiciones de encharcamiento en agua severo. La hoja se utilizó para preparar discos de hoja que se incubaron inmediatamente con L-cisteína 1 mM. Después de aproximadamente 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la decoloración rosada desapareció como se muestra en la Figura 8.

Tomados en conjunto, estos datos experimentales muestran que los discos de hoja de lechuga pueden ser inducidos por heridas para producir una coloración rosada que depende de PAL y PPO. Este fenotipo permite un procedimiento de escrutinio eficiente y eficaz para los mutantes de lechuga que tienen una decoloración inducida por la respuesta a la herida modificada canalizada a través de PAL, PPO o ambos.

Ejemplo 3

Escrutinio de mutantes con decoloración inducida por heridas reducida

Con el fin de identificar mutantes de lechuga con un bajo potencial de pardeamiento o enrojecimiento enzimático inducido por heridas, se aplicó el ensayo de discos de hoja descrito en el Ejemplo 2 a plantas de una población mutante de lechuga.

Se cultivaron 12000 plantas en un invernadero (Ubicación: De Lier, Países Bajos; siembra el 28 de marzo; plantación el 18 de abril; se cultivaron en condiciones normales de cultivo de lechuga) y de cada planta individual se tomó un disco de hoja (muestreo a partir del 15 de mayo) y se incubaron en grupos de (en promedio) 25 muestras entre papeles de filtro humedecidos a 5°C durante 7 días. Se otorgó una puntuación visual a cada disco de hoja dependiendo de la intensidad de la coloración rosada. Sobre la base de esta evaluación, se seleccionaron plantas de las cuales los discos de hoja mostraron un grado nulo o relativamente bajo de decoloración de la superficie de la herida. La planta con trazas apenas visibles de decoloración fue numerada 06D.210202.

De las 12000 plantas, finalmente se seleccionó 1 planta que mostró solo trazas de decoloración que eran apenas visibles y 11 que mostraron un nivel relativamente bajo de decoloración. El resultado de uno de estos ensayos se muestra en la Figura 9.

El ensayo de decoloración se repitió para los 12 individuos seleccionados inicialmente y en la mayoría de los casos individuales se confirmó el resultado original. Solo se seleccionaron los individuos confirmados para su posterior análisis y producción de semilla.

Ejemplo 4

Escrutinio de mutantes con decoloración inducida por heridas reducida

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

Se otorgó una puntuación visual a cada disco de hoja dependiendo de la intensidad de la coloración rosada. Sobre la base de esta evaluación, se seleccionaron plantas de las cuales los discos de hoja mostraron un grado nulo o relativamente bajo de decoloración de la superficie de la herida. De las 8500 plantas, se seleccionaron 8 plantas que no mostraron ninguna decoloración visible y 10 que mostraron una decoloración relativamente baja. El ensayo de decoloración se repitió para los 18 individuos que se seleccionaron inicialmente y para la mayoría de los casos individuales se confirmó el resultado original. Se muestran doce individuos en la Figura 10. Solo se seleccionaron los individuos confirmados para su posterior análisis y producción de semilla. Se le asignó el número 05D.202539 a una planta mutante sin efectos secundarios pleiotrópicos (p. ej., blanqueo, enanismo). La semilla producida por autofecundación de esta planta fue numerada 05D.810596. La semilla producida por autofecundación de tres plantas cultivadas a partir de semillas de 05D.810596 se numeró con el número 07G.9979 y se depositó en NCIMB. El número NCIMB es 41441 (depositado el 10 de octubre de 2006).

Ejemplo 5

Análisis fenotípico de los mutantes seleccionados que muestran una decoloración inducida por heridas reducida

De los 12 mutantes seleccionados del escrutinio presentado en el Ejemplo 3, 6 mostraron un crecimiento de fenotipo y blanqueo fuertemente reducido. Otros mutantes se desarrollaron normalmente, es decir, según el tipo de la población inicial del experimento de mutagénesis.

Los mutantes enanos y blanqueados probablemente presentan una alteración de la función del cloroplasto. Como la PPO reside en estos orgánulos celulares, esto puede explicar la respuesta relativamente baja en los ensayos de discos de hoja. Como tales mutaciones pleiotrópicas no son deseables, estos mutantes se consideraron menos relevantes.

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

Ejemplo 6

5 Confirmación de la casi ausencia de fenotipo de decoloración en los vástagos.

Para demostrar que la decoloración reducida de los mutantes de lechuga como la planta 06D.210202 de los Ejemplos 3 y 5 es causada por un efecto genético generado por el tratamiento de mutagénesis descrito en la presente memoria, se produjeron semillas por autofecundación. La semilla producida por autofecundación de la planta 06D.210202 fue numerada 06D.819784. Las semillas se hicieron germinar en el suelo y las plantas se sometieron a prueba para determinar la decoloración utilizando el ensayo de enrojecimiento del disco de hoja.

Este experimento mostró claramente que el fenotipo alterado tenía una base genética, ya que todas las plantas de la progenie mostraron un fenotipo similar, es decir, una fuerte reducción de la decoloración rosada, como el mutante que se utilizó para producir las semillas. Este resultado se ilustra en la Figura 11.

15 La semilla producida por autofecundación de tres plantas cultivadas a partir de semillas de 06D.819784 se numeró 06D.863B2 y se depositó en NCIMB. El número NCIMB es 41454 (depositado el 3 de enero de 2007).

Ejemplo 7

Desarrollo de un diagnóstico de escrutinio fenotípico para la decoloración de la lechuga inducida por heridas basada en la formación de pigmento pardo

20 Las plantas de lechuga se cultivaron hasta la madurez y se tomaron partes de las hojas externas cortando discos del tejido del nervio. Los discos se incubaron sobre papel de filtro humedecido a 16°C. Después de aproximadamente 72 horas, la superficie de la herida se había vuelto parda. En presencia de L-cisteína 10 mM, se inhibió la respuesta de pardeamiento, lo que indica que la decoloración observada está mediada por PPO. Un resultado representativo de tal experimento se muestra en la Figura 12.

25 Como la respuesta como se muestra en la Figura 12 es una respuesta de pardeamiento mediada por PPO, el procedimiento de escrutinio como se describe en este ejemplo puede considerarse eficaz sin sesgo para detectar mutantes que muestran una decoloración parda reducida que se produce durante el procesamiento de lechuga.

Ejemplo 8

Desarrollo de un diagnóstico de escrutinio fenotípico para la decoloración de la lechuga inducida por heridas basada en la conversión de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) en un pigmento de color negro llamado melanina

30 Además de los ensayos que abordan la decoloración inducida por heridas en un sentido amplio, el método de acuerdo con esta invención también permite escrutar de una manera más específica los mutantes que tienen una actividad PPO reducida. Se desarrolló un ensayo fenotípico que es indicativo de la actividad de la PPO utilizando discos de hoja que se incubaron en presencia de L-DOPA 1,5 mM. Cuando se hizo evidente una decoloración negra, se pudo concluir que la L-DOPA puede convertirse fácilmente mediante el sistema de oxidación de polifenoles en la superficie de la herida de las hojas de lechuga en un pigmento de color negro llamado melanina. La L-DOPA es convertida por PPO en la L-DOPA-quinona reactiva que es convertida no enzimáticamente a través de dopacromo y la indol quinona en la melanina de color negro.

40 Además, se demostró que la reacción se puede inhibir añadiendo L-cisteína 1 mM durante la reacción (Figura 5). Por lo tanto, este ensayo permite la identificación de mutantes cuya capacidad para montar una actividad de PPO en la superficie de una herida de una hoja se modifica. La respuesta de los discos de hoja de lechuga a la presencia de L-DOPA se puede observar tanto en la solución como entre los papeles de filtro humedecidos como se muestra en la Figura 13.

Ejemplo 9

45 Evaluación de los vástagos de un mutante que muestra una casi ausencia de decoloración para una respuesta de pardeamiento reducida utilizando el ensayo de pardeamiento de disco de nervio.

Para demostrar que la decoloración reducida de los mutantes de lechuga como la planta número 06D.210202 de los Ejemplos 3, 5 y 6 que presenta una decoloración rosada significativamente reducida de las superficies de la herida de los discos de hoja también resulta eficazmente reducida en la respuesta de pardeamiento inducida por heridas, se cultivaron hasta la madurez un número de plantas de la progenie.

50 En esta fase de desarrollo, se toman 3 discos de nervio central de las hojas exteriores de varias plantas de la progenie. Estos discos de nervio se incubaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7. Se muestra que las plantas de la progenie del mutante que se había demostrado anteriormente que presentaban una decoloración rosada

inducida por heridas fuertemente reducida también presentan un pardeamiento del nervio central inducida por heridas fuertemente reducido. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 14.

Ejemplo 10

5 Evaluación de los vástagos de un mutante que muestra una casi ausencia de decoloración para la respuesta del pardeamiento reducido utilizando cabezas de lechuga recién cortadas envasadas en bolsas de plástico

10 Las cabezas maduras de las plantas de lechuga cultivadas a partir de la semilla número 06D.819784 del Ejemplo 6, que presentan una decoloración rosada de las superficies de las heridas de los discos de hoja significativamente reducida, se cortaron en trozos con un cuchillo y se empaquetaron en una bolsa de plástico que contenía una atmósfera ambiente. Las plantas de control que muestran una respuesta de decoloración rosada del disco de hoja normal se trataron de manera idéntica. Las bolsas se almacenaron a 4°C durante 6 días, después de lo cual se evaluó la respuesta de pardeamiento del material de la hoja.

15 Este experimento demuestra que las plantas de la progenie del mutante que antes se mostraron en la decoloración rosada inducida por heridas fuertemente reducida también presentan un pardeamiento del nervio central inducido por heridas fuertemente reducido cuando se procesan y almacenan en bolsas de plástico utilizando una atmósfera ambiente. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 15.

REIVINDICACIONES

1. Una planta de lechuga mutante que tiene una modificación hereditaria inducida del genoma y que muestra una reducción de la respuesta de enrojecimiento y un hábito de crecimiento normal, en donde la modificación hereditaria, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal son los que se encuentran en una planta de lechuga, cuya semilla representativa se depositó con el número de acceso NCIMB 41454 o 41441, en donde la planta de lechuga mutante se puede obtener al cruzar dicha planta depositada con otra planta de la misma especie, y en donde la planta de lechuga mutante no se obtiene exclusivamente por un procedimiento esencialmente biológico.
2. Una planta de lechuga mutante como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el hábito de crecimiento normal comprende un tamaño, forma, crecimiento y color muy similares a las plantas de control.
3. Una planta de lechuga mutante como se reivindica en la reivindicación 1 ó 2, en donde las plantas muestran una fuerte inhibición de la respuesta de pardeamiento enzimático del tejido del nervio central herido.
4. Una planta de lechuga mutante como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la modificación hereditaria comprende mutaciones inducidas por ems.
5. La progenie de una planta de lechuga parental como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, cuya progenie tiene la modificación hereditaria inducida del genoma, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal que se encuentra en la planta de lechuga parental.
6. Una parte de una planta como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, cuya parte se selecciona en particular entre hoja, cabeza, tallo, brote, raíz, tubérculo, fruta, flor o trozos de la misma, y células.
7. Una parte como se reivindica en la reivindicación 6, para su uso en cultivo de tejidos para regenerar plantas que han conservado la modificación hereditaria del genoma, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal que se encuentra en la planta de la que deriva el tejido para el cultivo de tejidos.
8. Una planta de lechuga regenerada a partir de una parte de una planta como se reivindica en la reivindicación 6, que conserva la modificación hereditaria inducida del genoma, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal que se encuentra en el parental.
9. Una semilla de una planta como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 8, de cuya semilla se pueden cultivar plantas que tienen la modificación hereditaria inducida del genoma, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal como se define en la reivindicación 1.
10. Una semilla como se reivindica en la reivindicación 9, cuya semilla es de una generación adicional y ha conservado la modificación hereditaria inducida del genoma, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal como se define en la reivindicación 1.
11. Una progenie de una semilla como se reivindica en la reivindicación 9 o 10, que ha conservado la modificación hereditaria inducida del genoma, la reducción de la respuesta de enrojecimiento y el hábito de crecimiento normal que se encuentra en el parental.
12. Un producto derivado de una planta como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 8 y 11, que comprende una planta de lechuga o una parte de lechuga, lechuga procesada opcionalmente, en particular lechuga cortada, en donde el producto comprende la modificación hereditaria inducida del genoma y muestra la reducción de la respuesta de enrojecimiento como se define en la reivindicación 1.

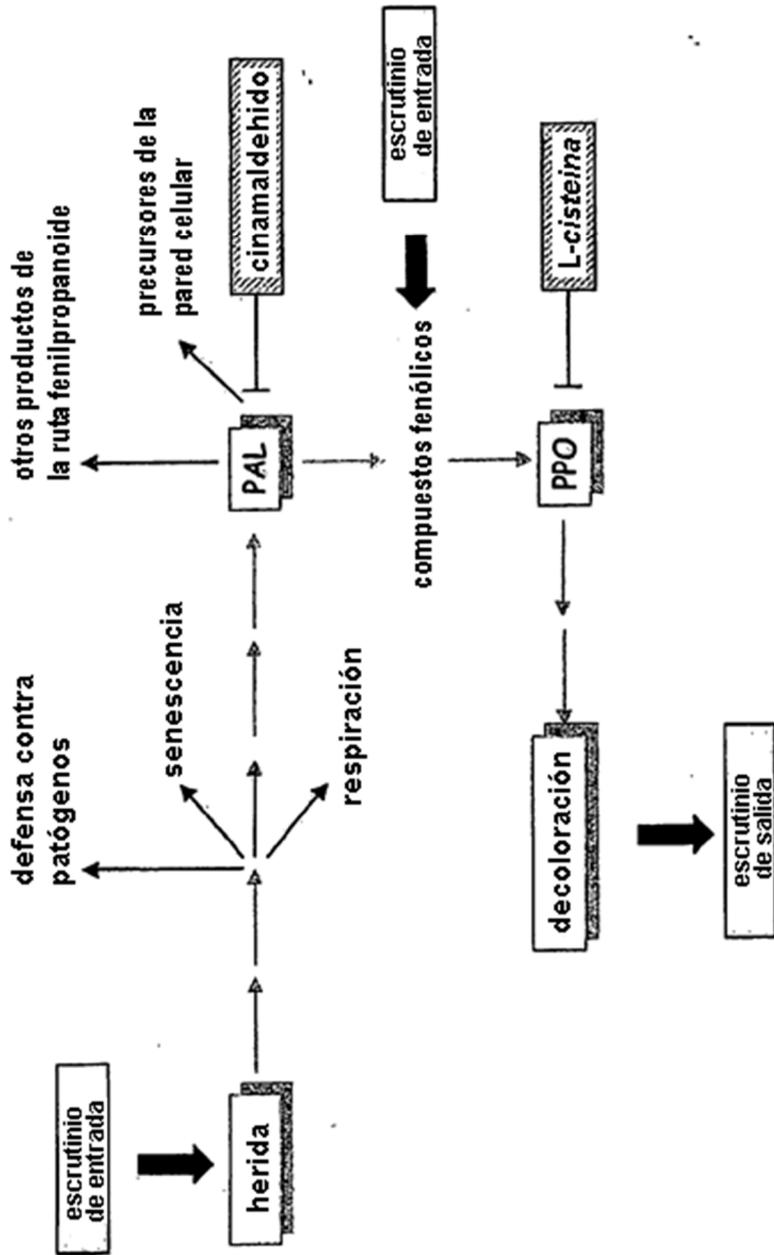


FIG. 1

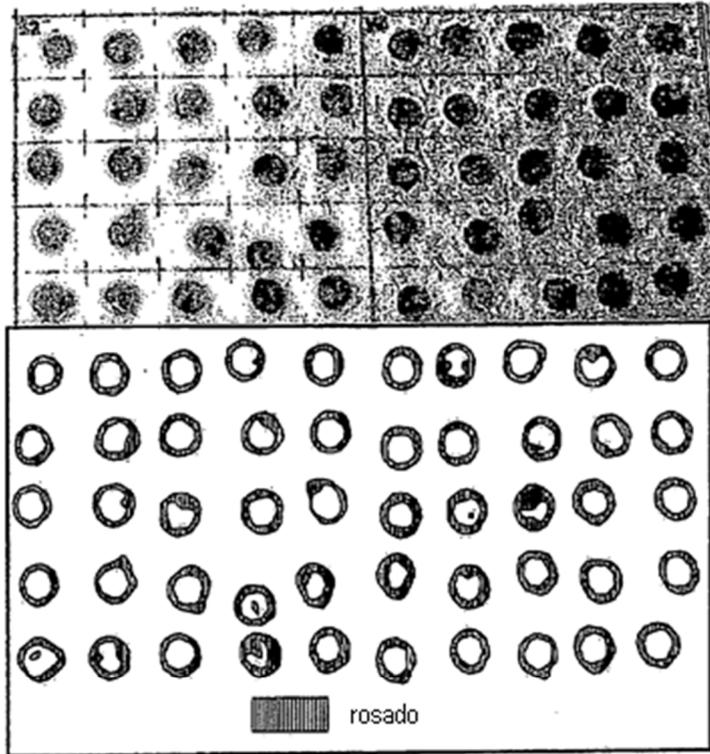


FIG. 2

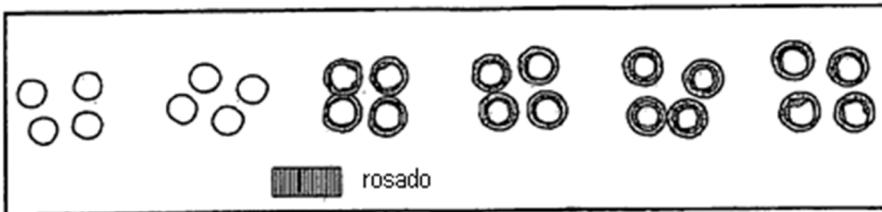
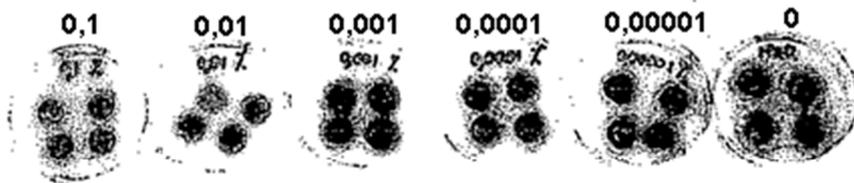


FIG. 3

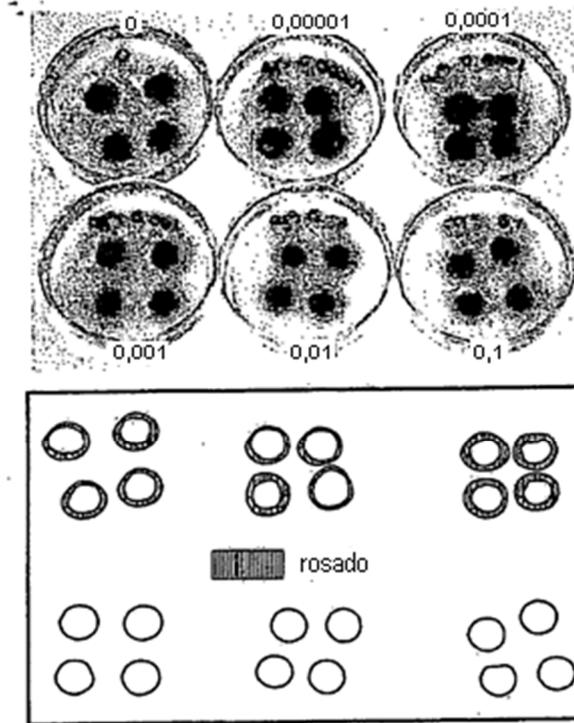


FIG. 4

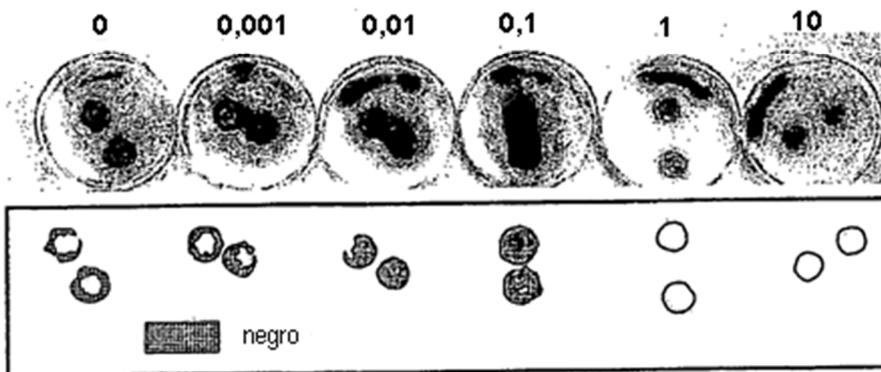


FIG. 5

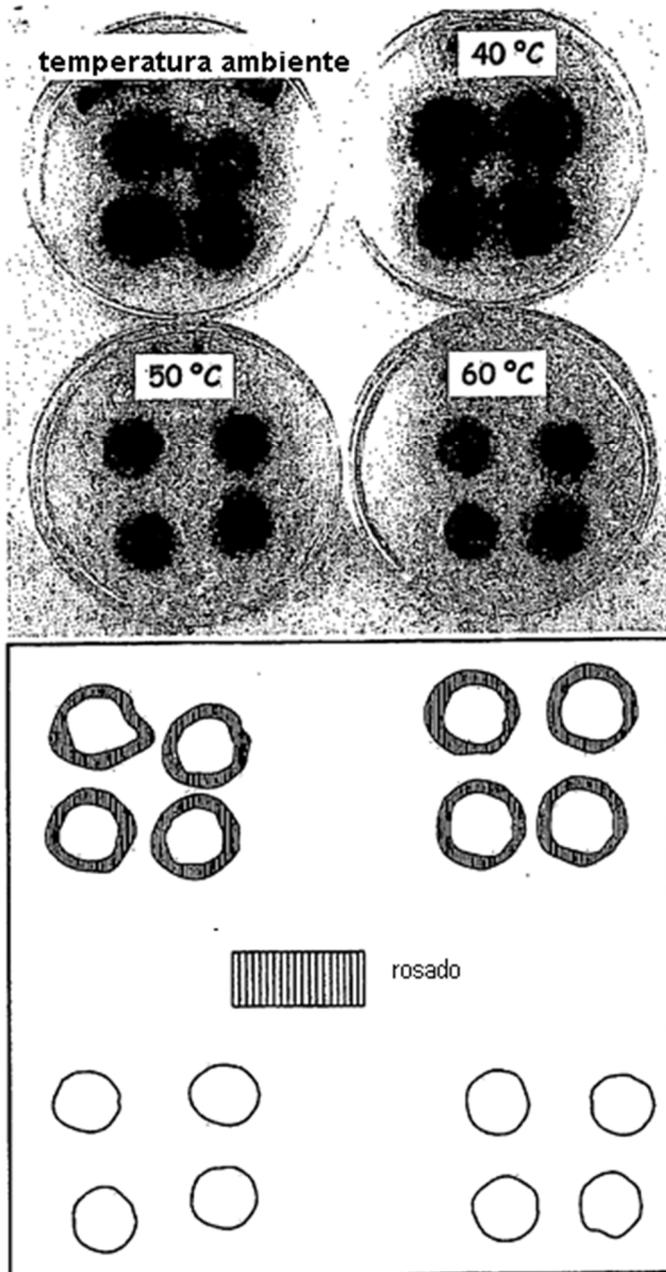


FIG. 6

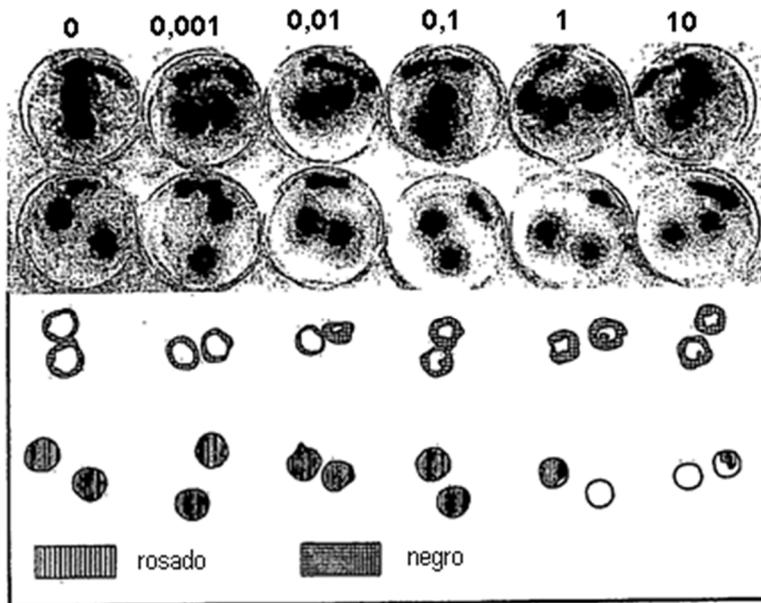


FIG. 7

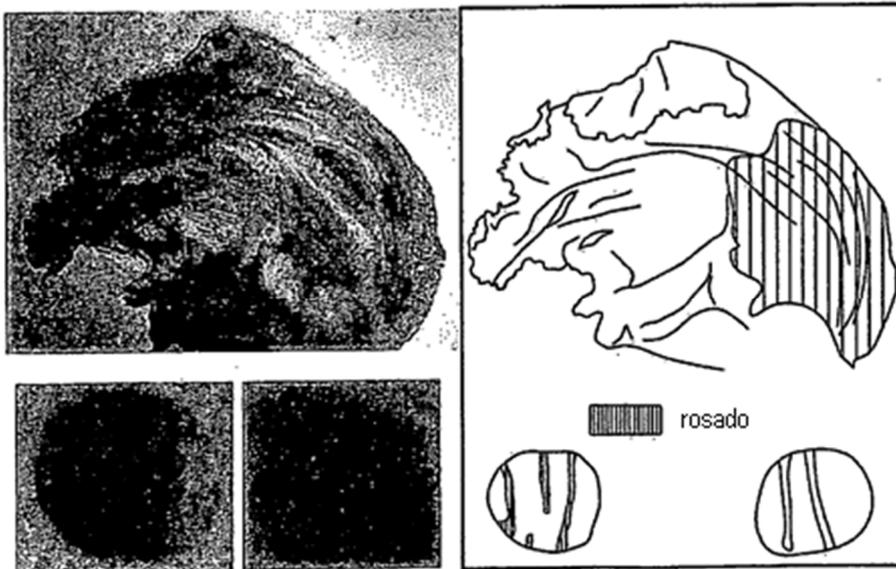


FIG. 8

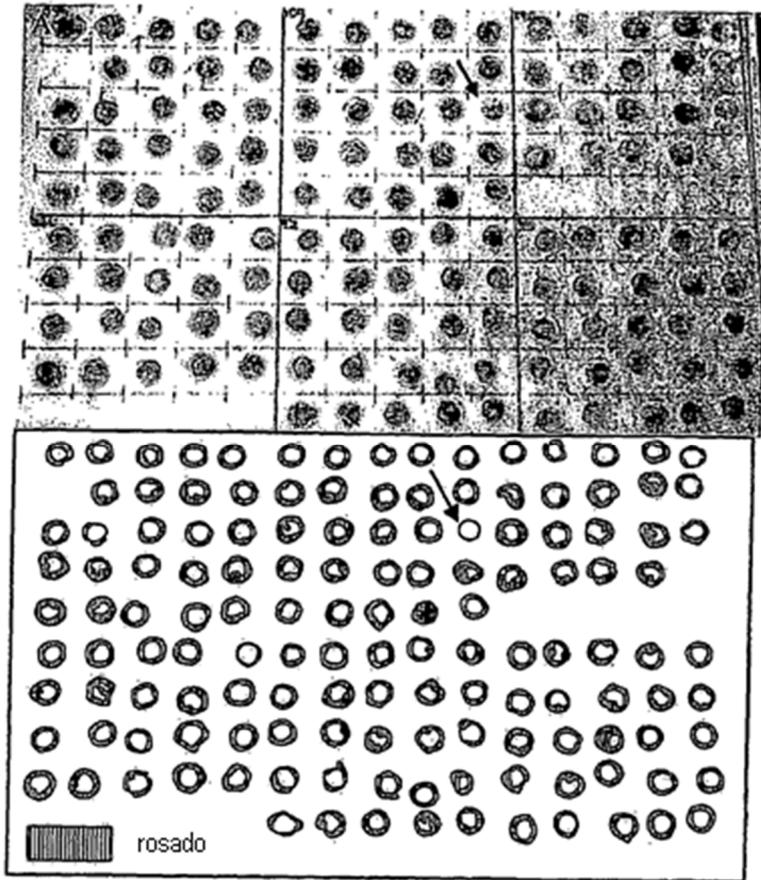


FIG. 9A

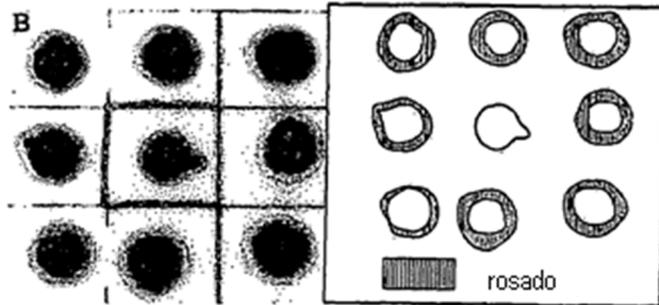


FIG. 9B

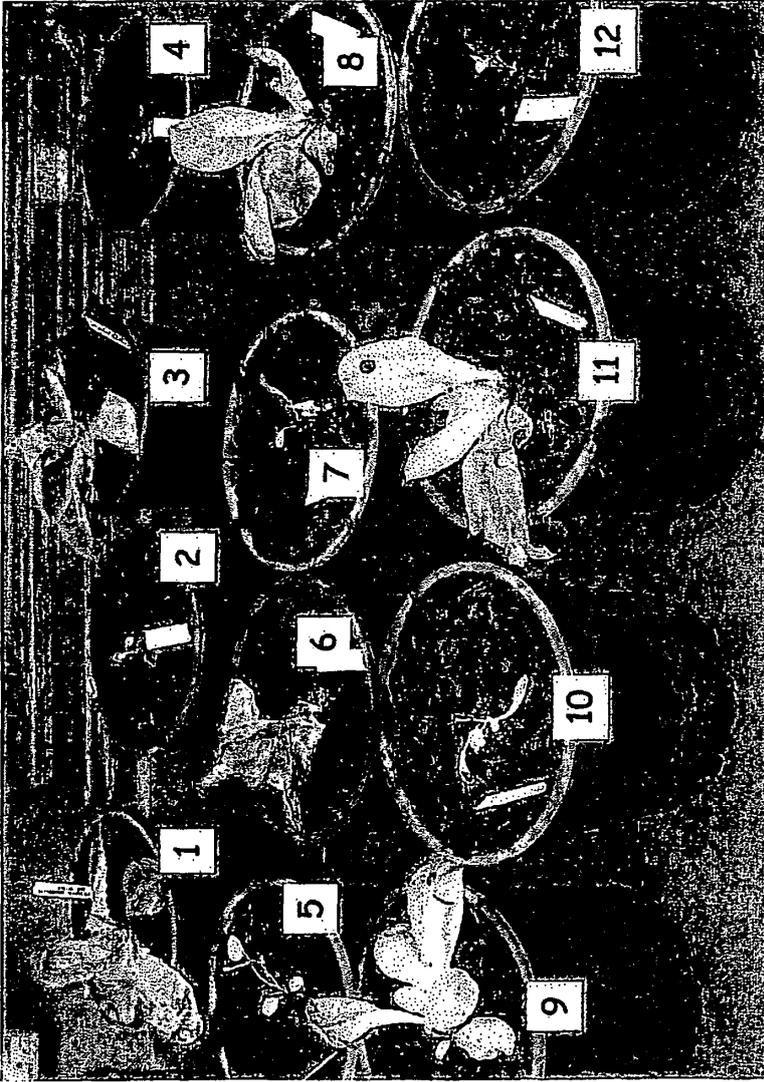


FIG. 10

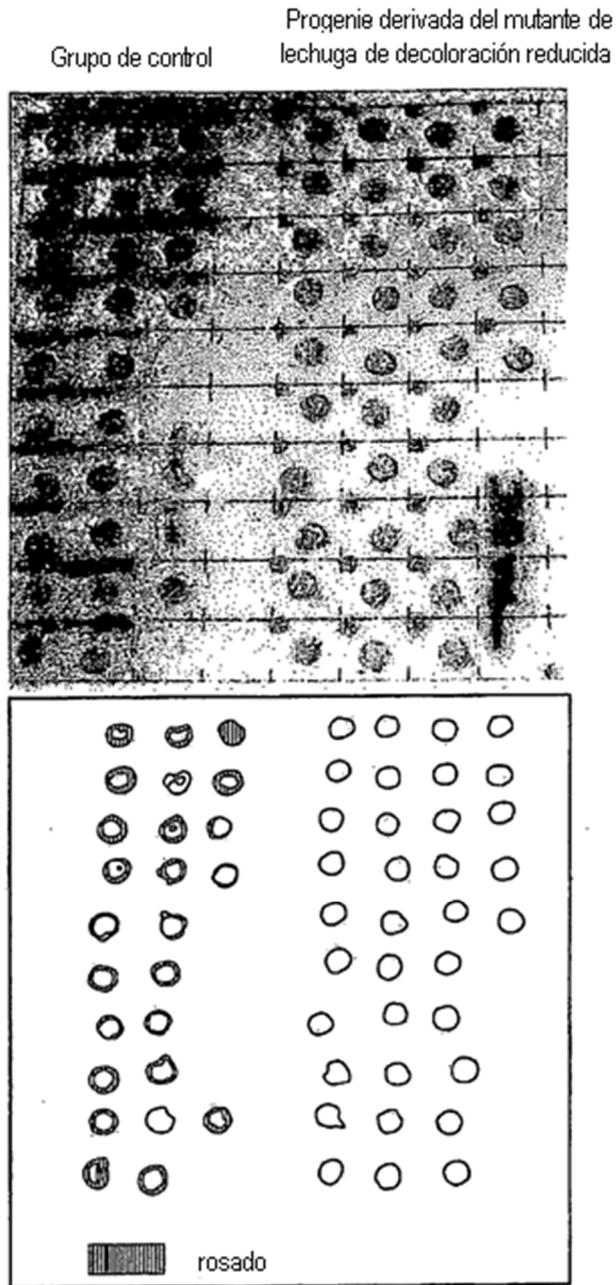


FIG. 11

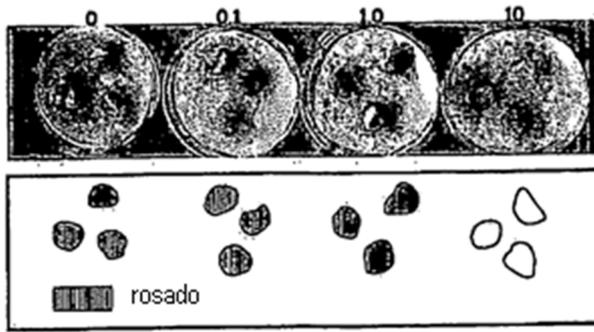


FIG. 12

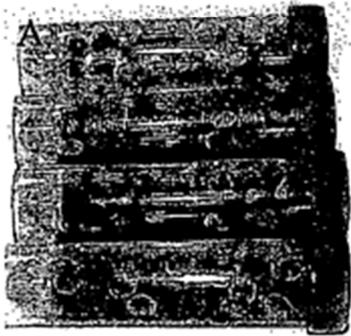


FIG. 13A

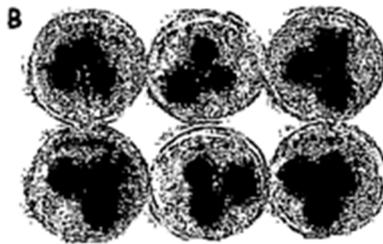
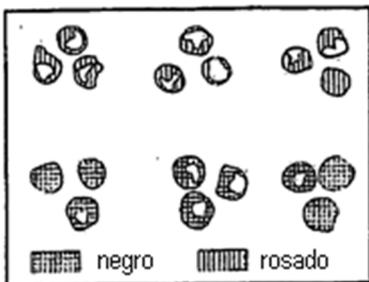
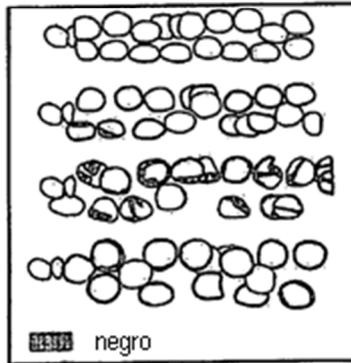


FIG. 13B

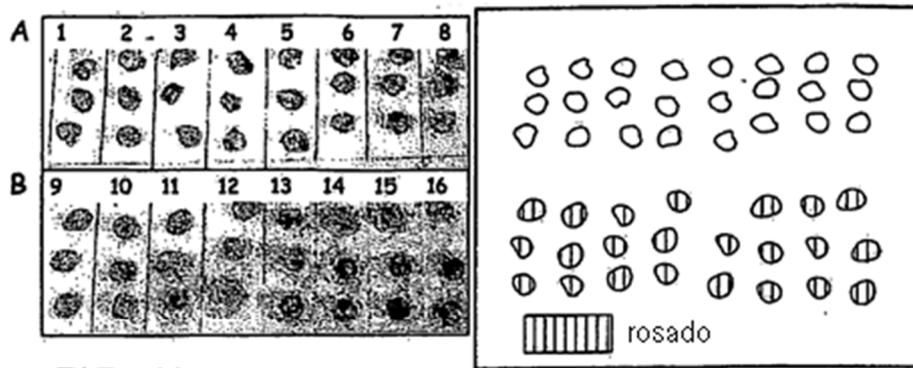


FIG. 14

planta de control

mutante de decoloración reducida

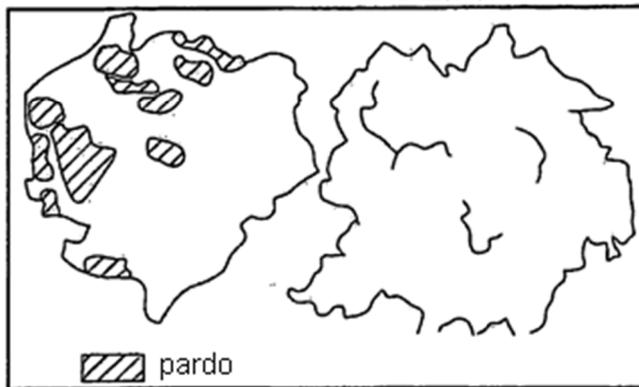
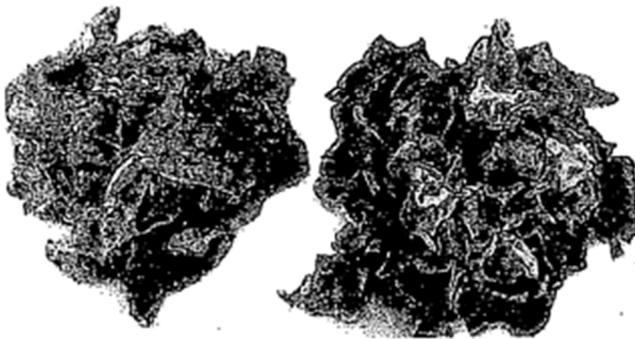


FIG. 15