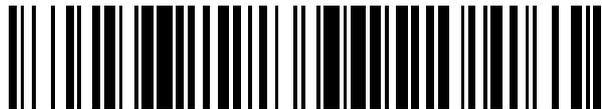


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 940**

51 Int. Cl.:

**A01H 1/04** (2006.01)

**A01H 5/08** (2008.01)

**A01H 5/12** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2008 PCT/EP2008/005491**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2009 WO09007066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2008 E 08773873 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2173157**

54 Título: **Método para someter a prueba material vegetal para determinar la decoloración reducida**

30 Prioridad:

**06.07.2007 EP 07075565**

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

**21.05.2020**

73 Titular/es:

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

**Burg. Crezeelaan 40  
2678 KX De Lier, NL**

72 Inventor/es:

**VAN VLIET, WILLEM;  
VAN DUN, CORNELIS, MARIA, PETRUS y  
SCHUT, JOHANNES, WILHELMUS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 761 940 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 para someter a prueba material vegetal para determinar la decoloración reducida

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para someter a prueba material vegetal para determinar la decoloración reducida, en particular decoloración de la superficie inducida por heridas, en comparación con el material vegetal de control.

**Antecedentes de la invención**

10 La cosecha y el posterior procesamiento, envasado y almacenamiento de los productos provocan una fuerte respuesta del material vegetal que, en general, conduce a una rápida reducción de la calidad del producto final. La calidad a este respecto se refiere a varios atributos como el color, el sabor, el olor y la textura crujiente que el consumidor percibe como fresca.

15 La respuesta del producto al procesamiento puede ser de naturaleza física, bioquímica y fisiológica combinada, lo que resulta en marchitez, decoloración y senescencia. Para mejorar la calidad de los productos procesados, será cada vez más importante desarrollar variedades de vegetales que muestren niveles reducidos de deterioro como consecuencia del procesamiento.

La lechuga es actualmente uno de los productos frescos que se ofrece cada vez más al consumidor en forma procesada, es decir, cortada, lavada y envasada. Este producto listo para el consumo contribuye a la conveniencia del consumidor, pero además permite el desarrollo de nuevos productos como mezclas de diferentes tipos de hortalizas de hoja u otros tipos.

20 El problema más importante que ocurre durante el procesamiento y almacenamiento de la lechuga es la decoloración de la superficie de la herida. Este trastorno se manifiesta como una coloración rosa o parda en la superficie de la herida de las hojas cortadas. Especialmente las secciones de nervadura media pueden mostrar una fuerte tinción a este respecto. Este rasgo de calidad negativa es el rasgo más importante que se controla durante el procesamiento, ya que el consumidor percibe la lechuga envasada con una decoloración rosa o parda como un producto deteriorado.

25 Aunque los tratamientos posteriores a la cosecha, como el envasado en una atmósfera controlada, evitan la decoloración y han mejorado la calidad de la lechuga fresca cortada y envasada, se prefiere una solución genética. Las razones son que, a pesar de estos tratamientos, una parte sustancial del producto todavía se pierde debido a causas tales como los envases dañados. Además, la vida útil después de que el usuario final abra el envase es muy corta. Y, lo que es más importante, implica un coste significativo.

30 Por lo tanto, el cultivo de plantas de lechuga que tienen rasgos de procesamiento mejorados, en particular una menor decoloración de la superficie, es de suma importancia para la industria de procesamiento de lechuga. Lo mismo se aplica al procesamiento de otro material vegetal, tal como la achicoria y la berenjena.

35 En "Larousse agricole (1981), Librairie Larousse, 3012203514, un método para someter a prueba si una planta muestra cierto rasgo en comparación con una planta de control. En "Larousse agricole (1981), Librairie Larousse, 3012203514, se describe un método para someter a prueba si una planta muestra un cierto rasgo en comparación con una planta de control. Sin embargo, no se describe qué criterios pueden utilizarse para identificar si una planta presenta decoloración de la superficie reducida. Sin embargo, no se describe qué criterios pueden utilizarse para identificar si una planta ha reducido la decoloración de la superficie.

40 Por lo tanto, el objeto de la invención es permitir someter a prueba de manera rápida y eficiente del material vegetal para determinar la decoloración de la superficie reducida para su uso en la producción de plantas de cultivo que son menos propensas al deterioro posterior a la cosecha.

**Compendio de la invención**

45 El procedimiento de decoloración inducida por la herida es un medio de una planta para defenderse contra el daño a través de las superficies de la herida causadas por patógenos, plagas o factores físicos (viento, lluvia, sequía, frío, calor, etc.). Por lo tanto, se espera que la variación natural para la decoloración inducida por la herida esté ausente debido a la selección natural. Las plantas que no son capaces de defenderse de las amenazas externas son más débiles y, por lo tanto, tienen menos posibilidades de sobrevivir a tales amenazas.

50 Sin embargo, sorprendentemente se encontró de acuerdo con la invención, como se describe en la reivindicación 1, que el material del banco de genes contiene una variación significativa en la decoloración, en particular la decoloración inducida por heridas. Los autores de la presente invención fueron capaces de demostrar esto utilizando un método para someter a prueba una planta o parte de una planta para determinar si mostraban una decoloración reducida o ausente en comparación con una planta o parte de una planta de control, cuyo método comprende

- a) proporcionar una planta o parte de una planta que se obtiene de una población de plantas que muestra variación

genética, en particular un banco de genes;

b) crear una superficie de la herida en la planta o en parte de una planta;

c) incubar la planta o parte de la planta o las superficies de la herida creadas sobre la misma para permitir que se produzca decoloración en la misma o sobre la misma;

5 d) observar la decoloración en o sobre las plantas o partes de la planta;

e) comparar la decoloración observada con la decoloración que se observa en la planta o la parte de la planta de control para evaluar si la planta o la parte de la planta no muestra decoloración o muestra una decoloración reducida en comparación con la planta o la parte de la planta de control; y

10 f) identificar una planta o parte de planta que no muestra decoloración o muestra una decoloración reducida en comparación con la planta o parte de planta de control como planta que alberga el rasgo de decoloración de la superficie inducida por la herida reducida.

En este método, la decoloración es el resultado de la conversión de un sustrato endógeno. Tal decoloración surgirá espontáneamente tras la incubación de la planta o parte de la planta en un determinado entorno durante un cierto período de tiempo. La decoloración en este caso es inducida por heridas. La invención se refiere particularmente a las reacciones enzimáticas naturales de enrojecimiento y pardeamiento. El método de la invención está destinado a identificar plantas que no muestran esta reacción o muestran una reacción reducida en comparación con un control.

15

Alternativamente, la variación en la decoloración se puede detectar mediante el uso de un método para someter a prueba una planta o parte de una planta para determinar si muestran una decoloración reducida o ausente en comparación con una planta o parte de una planta de control, cuyo método comprende:

20 a) proporcionar una planta o parte de una planta que se obtiene de una población de plantas que muestra variación genética, en particular un banco de genes;

b) incubar la planta o parte de la planta con un sustrato que se puede convertir en un pigmento coloreado para permitir que se produzca decoloración en la misma o sobre la misma;

c) observar la decoloración en o sobre las plantas o partes de la planta;

25 d) comparar la decoloración observada con la decoloración que se observa en la planta o la parte de la planta de control para evaluar si la planta o la parte de la planta no muestra decoloración o muestra una decoloración reducida en comparación con la planta o la parte de la planta de control; y

30 e) identificar una planta o parte de una planta que no muestra decoloración o muestra una decoloración reducida en comparación con la planta o parte de la planta de control como planta que alberga el rasgo de decoloración reducida.

En el segundo método, la decoloración es causada por la conversión de un sustrato añadido de forma exógena que puede convertirse en un sustrato coloreado que se hace visible cuando ocurre la reacción en la planta. Tal reacción de color puede ser o puede no ser inducida por la herida. Esto ocurre, por ejemplo, también en las cubiertas de semillas de semillas intactas. El método de selección de la invención está destinado a identificar plantas que no muestran esta reacción o muestran una reacción reducida en comparación con las de control.

35

Una vez que el material vegetal adecuado que alberga el rasgo de decoloración reducida, en particular el rasgo de decoloración de la superficie inducida por la herida reducida, se ha identificado con uno de estos métodos, tal material vegetal se utiliza de acuerdo con la invención para introducir el rasgo en cultivos comerciales. Tales plantas de cultivo mejoradas también son parte de esta invención.

40 La presente invención se basa por lo tanto, en el uso de una fuente específica de material vegetal que se somete a prueba. El material cultivado no muestra mucha variación con respecto a la decoloración. Inesperadamente, se descubrió que, por el contrario, el plasma germinal que se encuentra en los bancos de genes, tal como las accesiones, tiene una variación significativa en la decoloración, en particular la decoloración de la superficie inducida en la superficie de la herida. Una accesión es un espécimen de una especie, con una localidad determinada. Las accesiones se almacenan, por ejemplo, en bancos de genes o bibliotecas.

45

En una realización preferida de esta invención, los ensayos de decoloración descritos anteriormente se utilizan como una herramienta eficiente para escrutar variantes genéticas de origen natural en especies de cultivos. La invención es particularmente útil para someter a prueba el germoplasma de lechuga, por ejemplo de la especie *Lactuca sativa* así como especies relacionadas como *Lactuca seriola*, *Lactuca virosa* etc.

50 La invención también se puede utilizar para cultivos que se cultivan para partes de hojas o tallos (endibia, achicoria), tubérculos de raíz o tallo (patata, batata, apio), partes de frutas (berenjenas, manzanas, plátanos, aguacate, melocotón, peras, albaricoque, mango), flores o partes de flores (alcachofa, gerbera, crisantemo) y hongos.

A este respecto, también se pueden utilizar otros ensayos que detectan la decoloración, en particular la decoloración de la superficie de la lechuga inducida por heridas, por ejemplo, evaluaciones visuales de lechuga procesada en diferentes fases de maduración.

5 Mediante la utilización de tales ensayos, se han identificado accesiones de diferentes especies de *Lactuca* que contienen una variación significativa en la decoloración de la superficie inducida por la herida, en particular de las hojas. Las plantas individuales identificadas por el método descrito por esta invención que tienen una decoloración inducida por la herida reducida o ausente se utilizan en el cultivo para desarrollar plantas de lechuga que se mejoran con respecto a sus características de procesamiento posterior a la cosecha, especialmente con respecto a la decoloración de la superficie de la herida. Tales variedades son especialmente útiles para el mercado de conveniencia.

10 Además, el escrutinio de un conjunto de accesiones de berenjenas en bancos de genes reveló también accesiones con decoloración reducida. El uso de estas accesiones en el desarrollo de berenjenas con decoloración reducida también es parte de esta invención.

15 Los autores de la presente invención describen adicionalmente el uso de plantas que se identifican mediante el método de la invención como la fuente del rasgo de decoloración de la superficie inducida por la herida reducida. Esta fuente se puede utilizar como progenitor en un cruce convencional o como donante de material genético que subyace a este rasgo.

### Descripción detallada de la invención

20 El desarrollo de plantas y, en última instancia, variedades de plantas, con una decoloración de la superficie de la herida reducida a lo largo del cultivo, inicialmente requiere la identificación de variantes genéticas para este rasgo. Esta invención se refiere a esta etapa de identificación inicial y a la etapa adicional de introducción del rasgo en plantas de cultivo comerciales. Una vez que se ha identificado esta primera planta progenitora que proporciona el rasgo deseado, el desarrollo de variedades de plantas es entonces una cuestión de rutina para el cultivador experto.

La decoloración de la superficie inducida por heridas es una respuesta específica de una planta tras el corte u otras alteraciones mecánicas destinadas a la curación de la herida y la defensa contra la invasión patógena.

25 Una respuesta a la herida es una respuesta biológica compleja de una planta a una lesión física que se manifiesta tanto local como sistémicamente. La respuesta local está dirigida principalmente a cerrar la superficie de la herida, que se produce por la muerte local de las células en o justo detrás de la superficie de corte. Se pueden observar lignificación o suberización en la superficie de la herida en muchas especies de plantas, lo que conduce a una nueva barrera de aislamiento eficaz entre el organismo de la planta y el entorno.

30 Además de estos efectos visibles, se conoce que se inducen otras respuestas como el aumento de la respiración o la producción de etileno. A nivel bioquímico, los estudios han demostrado que las heridas pueden conducir a la inducción de la vía fenilpropanoide que se requiere para entre otros la producción de polifenoles o ligninas.

35 La enzima clave para esta vía es la fenilalanina amoniaco liasa (PAL), que se potencia tras la lesión por la inducción de la expresión génica de al menos una de las isoformas de PAL. Esta respuesta conduce a la formación de polifenoles que son oxidados por la polifenol oxidasa (PPO). La PPO reside en los plástidos y se libera y se activa después de que se produzca la herida. La oxidación de los polifenoles conduce a la formación de las quinonas altamente reactivas. Estas quinonas pueden reaccionar con aminoácidos o proteínas, lo que conduce a una decoloración rosa, parda o incluso negra.

40 En lechuga, esta respuesta también se puede observar. Cuando las hojas de lechuga cortadas se almacenan en una bolsa de plástico con aire, la superficie cortada comienza a desarrollar un componente rosáceo en las superficies de la herida que gradualmente se vuelve parda después de un almacenamiento prolongado. Los análisis bioquímicos detallados han demostrado que esta respuesta requiere la *síntesis de novo* de polifenoles que posteriormente se oxidan, lo que conduce a una cascada de reacciones que finalmente se pueden observar como una coloración rosa o parda en la superficie de la herida.

45 Los tratamientos posteriores a la cosecha que se han desarrollado y que actualmente aplica la industria de procesamiento de lechuga contrarrestan esta respuesta particular. La presente invención proporciona un método genético para contrarrestar esta respuesta particular que se puede aplicar para reducir o eliminar los tratamientos posteriores a la cosecha destinados a la decoloración inducida por la herida.

50 Con el fin de permitir el desarrollo de cultivos con características de procesamiento mejoradas, se utiliza un método de acuerdo con la invención que permite la detección eficiente de la decoloración de la superficie que es diagnóstico para la decoloración posterior a la cosecha de plantas de cultivo cortadas heridas, en particular lechuga.

Estos métodos se han descrito en solicitudes en tramitación con la presente PCT/EP2007/000226 y PCT/EP2007/000230.

En una realización preferida, se toman discos de hojas de plantas de lechuga y se incuban entre papeles de filtro

- 5 humedecidos. Tras la incubación, se desarrollará una decoloración rosa que es diagnóstica para el enrojecimiento y pardeamiento inducido por la herida de la lechuga procesada. Por lo tanto, tal método permite un escrutinio muy eficiente de poblaciones de lechuga en las que reside la variabilidad genética para determinar la presencia de variantes genéticas que tienen una decoloración de la superficie de la herida reducida y, por lo tanto, una calidad de procesamiento mejorada.
- Tras la identificación satisfactoria de tales plantas individuales, se pueden utilizar para cultivar plantas de lechuga mejoradas y, en última instancia, desarrollar variedades de lechuga que son particularmente útiles para el procesamiento.
- 10 Con el fin de identificar plantas con el rasgo de decoloración de la superficie inducida por la herida reducida, se aprovecha la variación genética natural. La variación genética natural es la variación en la estructura primaria del ADN que ocurre dentro del germoplasma de tales especies y que es el resultado de errores durante la replicación y su mantenimiento dentro del ADN de las células germinales.
- La aparición de tales polimorfismos genéticos dentro de una población está determinada por la idoneidad de la mutación espontánea en un contexto genético dado, así como por la selección impuesta por el entorno.
- 15 Para la lechuga esta variación natural está presente en la especie *Lactuca sativa* pero también en otras especies de *Lactuca*, tal como *Lactuca serriola*, *Lactuca saligna* o *Lactuca virosa*. Las plantas identificadas de acuerdo con la invención, por lo tanto, también se pueden identificar en estas especies y utilizarse para producir plantas de lechuga que albergan la decoloración superficial inducida por la herida reducida. La razón subyacente es que la barrera de cruce natural interespecífica no es absoluta y, si es necesario, se puede superar mediante tecnologías conocidas por el experto en la técnica, tal como el rescate de embriones.
- 20 La variación natural ocurre en el material vegetal que reside en las compañías o institutos de cultivo como bancos de genes en forma de semillas. Para determinar la presencia de variantes con una decoloración de la superficie de la herida reducida, el material vegetal se cría en condiciones normales, por ejemplo, en un invernadero o en un campo. En la fase de planta joven, se pueden tomar muestras, por ejemplo, discos de hojas, de las plantas individuales y determinar el grado de decoloración utilizando uno de los métodos descritos anteriormente. Este enfoque para identificar lechugas u otras plantas de cultivo que se reducen con respecto a su decoloración inducida por la herida es mucho más eficiente que un método en el que el cultivo se cultiva hasta una fase madura, se cosecha, se procesa y se evalúa la calidad del procesamiento.
- 25 Además, los parientes silvestres de la lechuga cultivada se pueden desarrollar de una manera completamente diferente, lo que hace que un análisis comparativo sea menos obvio. Como se descubrió que la respuesta del disco de la hoja que se manifiesta como una decoloración de la superficie rosa es diagnóstica para la decoloración posterior a la cosecha, el método de la presente invención puede identificar plantas en una fase temprana de desarrollo sobre la base de una reacción bioquímica que se puede utilizar para mejorar las características posteriores a la cosecha de la lechuga u otros cultivos.
- 30 Este enfoque permite una comparación más fácil y fiable de diferentes tipos de plantas. Sorprendentemente se encontró que dentro del género *Lactuca* se puede observar una variación significativa para la decoloración inducida por la herida.
- Las plantas de lechuga con un nivel reducido o ausencia de decoloración inducida por la herida que se han encontrado de acuerdo con la invención se pueden utilizar en un programa de cultivo regular para desarrollar variedades adaptadas a los requisitos de la industria de procesamiento. En tal programa de cultivo, los cultivadores pueden utilizar métodos de cultivo conocidos y regulares como mapeo QTL, selección asistida por marcadores y retrocruzamiento, para combinar el nivel reducido de decoloración inducida por la herida con otras características deseadas de la lechuga cultivada, es como la resistencia a patógenos y plagas, ausencia de producción de semillas y puntas quemadas, etc.
- 40 Los expertos en la técnica describen adicionalmente un método para producir plantas con decoloración superficial inducida por la herida reducida, que comprende las etapas de:
- 45 a) cruzar una primera planta progenitora con decoloración de la superficie inducida por la herida reducida con una segunda planta progenitora para obtener semilla F1;
- b) cultivar plantas F1 a partir de las semillas F1 y autofertilizar las plantas F1 para obtener semillas F2;
- 50 c) seleccionar plantas F2 para determinar los niveles de decoloración de la superficie inducida por la herida que son inferiores a los niveles de al menos la segunda planta progenitora como plantas que albergan el rasgo de decoloración de la superficie inducida por la herida reducida. Estas plantas y su progenie que retiene el rasgo de decoloración de la superficie inducida por la herida reducida son plantas de la invención.
- Preferiblemente, la segunda planta progenitora es una planta progenitora cultivada que tiene características aceptables desde el punto de vista agronómico, en particular lechuga.

En una realización preferida, el primer progenitor se selecciona entre las plantas enumeradas en la Tabla 2.

El segundo progenitor puede ser cualquier lechuga, pero preferiblemente es una lechuga cultivada, tal como la lechuga iceberg Silvinas RZ.

5 El rasgo que se denomina en la presente memoria "rasgo de decoloración de la superficie inducida por la herida reducida" está presente en una planta cuando la puntuación en la prueba de enrojecimiento descrita en el Ejemplo 1 es menor que 3, preferiblemente menor que 2, más preferiblemente 1.

10 Ahora se muestra que la variación se encuentra en poblaciones de origen natural, pero también puede ser inducida por mutagénesis. Esto crea la posibilidad de combinar diferentes fuentes de variación para crear un nivel sin precedentes de decoloración inducida por la herida. La combinación de diferentes fuentes de variación inducidas por la herida reducida se puede realizar cruzándolas, dando como resultado una o más semillas híbridas. Si una planta híbrida de una de esas semillas muestra una decoloración inducida por la herida más reducida, se puede utilizar directamente en la práctica.

15 En cualquier caso, una planta híbrida puede autofertilizarse para obtener una población F2. Esta población F2 se puede utilizar para evaluar el alelismo, es decir, ambas fuentes proporcionan una decoloración reducida de los alelos en el mismo lugar. En ausencia de alelismo, es posible encontrar individuos F2 con un nivel alto normal, así como individuos F2 con un nivel más reducido de decoloración de la superficie de la herida que ambos progenitores. Las últimas plantas F2 llevan una combinación de alelos para reducir la decoloración de ambos progenitores y se pueden utilizar para el cultivo adicional.

20 El procedimiento de combinar alelos para reducir la decoloración puede ser apoyado por marcadores moleculares, como AFLP, SFP, etc. Pueden utilizarse ensayos adicionales para distinguir diferentes niveles de decoloración reducida, como la evaluación visual de las hojas cortadas almacenadas de plantas maduras, para identificar las plantas con las altas reducciones en la decoloración de la superficie de la herida como resultado de alelos combinados de diferentes fuentes.

25 La invención se ilustrará adicionalmente en los Ejemplos que siguen y que se proporcionan solo con fines ilustrativos. En los Ejemplos se hace referencia a las siguientes figuras:

**Figura 1:** Ensayo de enrojecimiento del disco de hoja de accesiones de *Lactuca*. La variabilidad de la respuesta que se manifiesta como diferentes grados de decoloración rosa se observa entre las accesiones.

**Figura 2:** Imágenes de cogollos de lechuga iceberg de número 07V.67586 con decoloración reducida y cv. 'Silvinas' con decoloración normal.

30 **Figura 3:** Respuesta de pardeamiento de berenjenas recién cortadas. A la izquierda se muestra el tejido de la fruta unas horas después del corte almacenado a temperatura ambiente. A la derecha se muestra tejido de la fruta que ha sido incubado durante 24 horas a temperatura ambiente. Se puede observar claramente el pardeamiento de la semilla.

35 **Figura 4:** Corte de rodajas de berenjena y la respuesta de pardeamiento. A la izquierda se han incubado dos medias rodajas a temperatura ambiente durante 24 horas en un tampón mes 50 mM pH = 5,5. A la derecha, las medias rodajas se incubaron en las mismas condiciones, pero con 10 mM de L-cisteína añadida.

**Figura 5:** Decoloración negra de las semillas de berenjena tras la incubación de las semillas en una solución que contiene L-DOPA 4 mM. Pocillo 1: control negativo (solo tampón), pocillo 2-6: L-DOPA 4 mM, pocillo 3-6: además 0,1, 1,0, 5,0 y L-cisteína 10 mM, respectivamente.

40 **Figura 6:** Escrutinio del material genético de la berenjena para detectar variaciones en la actividad de PPO asociada a la semilla en base a la incubación de semillas con el sustrato de PPO L-DOPA. Los pocillos de las columnas 2, 4 y 6 contienen L-DOPA 4 mM, mientras que las columnas 1,3 y 5 contienen solo tampón.

45 En esta placa se analiza material genético diferente en forma de semillas de berenjena. Cada lote de semillas se analiza lado a lado con y sin L-DOPA en las posiciones A1 y A2, A3 y A4, A5 y A6, B1 y B2, B3 y B4, B5 y B6, C1 y C2, C3 y C4, C5 y C6, D1 y D2, D3 y D4, D5 y D6. Los lotes en la posición C5 y C6, D1 y D2, D3 y D4, D5 y D6 muestran la mayor actividad de PPO asociada a la semilla.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Escrutinio de poblaciones de *Lactuca* para la decoloración de la superficie de la herida reducida

50 Se escrutaron las accesiones de lechuga para determinar su potencial para mostrar decoloración inducida por la herida. Las semillas germinaron en bandejas que contenían tierra para macetas en un invernadero utilizando condiciones convencionales para el cultivo de la lechuga. Se muestrearon plantas jóvenes que habían desarrollado 3-

5 4 hojas verdaderas utilizando un barrenador de corcho. Se incubaron los discos de hoja así obtenidos entre papeles de filtro humedecidos en un recipiente a 6°C. Después de aproximadamente una semana, la decoloración rosa se puntuó en una escala de 1 a 5 en la que 1 significa que no hay decoloración rosa detectable y 5 significa, un nivel máximo de decoloración rosa muy claro. El resultado se muestra en la **Tabla 1**. Esta tabla muestra la referencia interna y su puntuación respectiva. Las accesiones que se confirmó que tenían una decoloración rosa reducida se identifican a continuación.

Un ejemplo de las diferencias observadas en la reacción de enrojecimiento de diferentes accesiones utilizando el ensayo de disco de hoja de enrojecimiento se muestra en la **Figura 1**.

10 Sorprendentemente, se encontró que varias accesiones mostraron una decoloración reducida. Esto fue inesperado, porque este rasgo se considera una desventaja en condiciones naturales y del cultivador, ya que se considera que el procedimiento que produce decoloración protege a la planta contra factores de estrés biótico y abiótico adversos que entran a través de la zona herida.

15 Las accesiones más interesantes de esta prueba se volvieron a mostrar y se volvieron a someter a prueba de acuerdo con el mismo protocolo mencionado anteriormente. Se confirmó la reducción de enrojecimiento para el número 651968 (*L.virosa*; parcela nr. 366, NCIMB 41489). Se sometieron a prueba accesiones adicionales de acuerdo con el mismo protocolo mencionado anteriormente y se volvieron a someter a prueba para confirmar. Se encontró una reducción de enrojecimiento y se confirmó para el número 650147 (*L.saligna*; NCIMB 41485). Las accesiones que se descubrió que mostraban una decoloración de la superficie inducida por la herida reducida se enumeran en la **Tabla 2**.

20 Las accesiones bien conocidas tal como 'Iceberg' y 'Salinas' no mostraron signos de enrojecimiento reducido en esta prueba.

**Tabla 2**

Descripción de las accesiones con decoloración reducida de las superficies de la herida.			
número	especie	tipo	número de acceso
651968	<i>L.virosa</i>		NCIMB 41489
650147	<i>L.saligna</i>		NCIMB 41485
07V.67586	<i>L. sativa</i>	Arrepollada	NCIMB 41569

Las semillas de los números 651968, 650147 y 07V.67586 se depositaron en NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Escocia, AB21 9YA, Reino Unido.

25

**Tabla 1**

Puntuación de enrojecimiento de diferentes accesiones de <i>Lactuca</i> . Cada número de campo se refiere a una accesión individual. Se tomaron muestras de dos plantas por accesión. La puntuación indica el nivel de enrojecimiento: 1 = no enrojecimiento a 5 = enrojecimiento fuerte. En caso de que las dos plantas difieran en enrojecimiento se indican dos puntuaciones. En caso de que se indique una puntuación, las dos plantas reaccionaron de forma idéntica en la prueba.							
Veld nr.	Puntuación	Veld nr.	Puntuación	Veld nr.	Puntuación	Veld nr.	Puntuación
1	5	195	5 en 4	257	4	319	4
2	3	196	5	258	4	320	5
3	3	197	5	259	5	321	5 en 2
4	3	198	5	260	5	322	5 en 2
5	5	199	5	261	4	323	2 en 1
6	5	200	5	262	4	324	4 en 3
7	5	201	5	263	4	325	5

ES 2 761 940 T3

Puntuación de enrojecimiento de diferentes accesiones de *Lactuca*. Cada número de campo se refiere a una accesión individual. Se tomaron muestras de dos plantas por accesión. La puntuación indica el nivel de enrojecimiento: 1 = no enrojecimiento a 5 = enrojecimiento fuerte. En caso de que las dos plantas difieran en enrojecimiento se indican dos puntuaciones. En caso de que se indique una puntuación, las dos plantas reaccionaron de forma idéntica en la prueba.

Veld nr.	Puntuación	Veld nr.	Puntuación	Veld nr.	Puntuación	Veld nr.	Puntuación	
8	4	202		5	264	4	326	5
9	4	203		5	265	4	327	4
10	4	204		5	266	4	328	2
11	3	205		5	267	5	329	2 en 3
12	4	206		5	268	4	330	1
13	5	207		5	269	4	331	2
14	5	208		5	270	4	332	3
15	5	209		5	271	5	333	2 en 3 en 5
16	5	210		5	272	5	334	6
17	3	211		5	273	5	335	5
18	5	212		5	274	5	336	5
19	5	213		5	275	5	337	3
20	6	214		5	276	1 en 3	338	5
21	2	215		5	277	2 en 5	339	4
154	6	216		5	278	1 en 4	340	5
155	5	217		5	279	5	341	3
156	6	218		5	280	5	342	2 en 1
157	6	219	planta nog te Klein	281	5	343		4
158	5	220		4	282	5	344	5
159	4	221		4	283	5	345	5
160	5	222		4	284	3	346	5
161	5	223		4	285	5	347	4
162	6	224		3 en 4	286	5	348	5
163	5	225		4	287	3 en 5	349	5
164	4	226		4	288	5	350	5
165	5	227		4	289	5	351	5
166	5	226		5	290	5	352	5
167	5	229		5	291	3 en 5	353	4
168	5	230		5	292	5	354	5
169	5	231		4	293	5	355	4
170	5	232		4	294	5	356	5

ES 2 761 940 T3

Puntuación de enrojecimiento de diferentes accesiones de *Lactuca*. Cada número de campo se refiere a una accesión individual. Se tomaron muestras de dos plantas por accesión. La puntuación indica el nivel de enrojecimiento: 1 = no enrojecimiento a 5 = enrojecimiento fuerte. En caso de que las dos plantas difieran en enrojecimiento se indican dos puntuaciones. En caso de que se indique una puntuación, las dos plantas reaccionaron de forma idéntica en la prueba.

Veld nr.	Puntuación							
171	5	233		4	295	5	357	4
172	5	234		4	296	5	358	4
173	5	235		4	297	5 en 4	359	3
174	5	236	2 en 4		298	2 en 4	360	4
175	6	237		2	299	4	361	4
176	4	238		4	300	2 en 3	362	4
177	2	239		4	301	4	363	3
178	5	240		4	302	4	364	3
179	2	241		4	303	4	365	3
180	5	242		4	304	5	366	2
181	5	243		4	305	6	367	2
162	5	244		5	306	5	368	3
183	6	245		5	307	5	369	2
184	3	246		5	308	5	370	4
185	5	247	3 en 4		309	5	371	4
186	S	248		4	310	5	372	3
187	3	249		5	311	5	373	3 en
188	5	250		4	312	5	374	3
189	5	251		4	313	2 en 5	375	4
190	5	252		4	314	3 en 6	376	5
191	5	253		4	315	5	377	5
192	5	254		4	316	5	378	5
193	5	255		4	317	5 en 3	379	5
194	5	256		4	316	5	360	5

Ejemplo 2

Escrutinio de campo

5 Se realizó un escrutinio de campo mediante evaluación visual de cogollos de lechuga arropollada cortadas. En una accesión se observó una decoloración reducida de las superficies de la herida (Figura 2). Esta accesión tiene el número 07V.67586. Se volvió a someter a prueba mediante evaluación visual en una prueba de campo siguiente y se confirmó que tenía una decoloración reducida. Esta evaluación visual se realizó un día después del corte. Sorprendentemente, una prueba de seguimiento de acuerdo con el protocolo mencionado en el Ejemplo 1 no mostró enrojecimiento reducido. Esto podría ser una indicación de una causa genética diferente de decoloración reducida en el número 10 07V.67586 que en las otras accesiones descritas en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Decoloración reducida en berenjena

Al cortar y envasar las frutas de berenjena se puede observar una rápida reacción de pardeamiento. La superficie de la herida del tejido de la fruta cortada se vuelve parda rápidamente, lo que reduce la calidad del producto. Más importante aún, las semillas integradas dentro de la pulpa de la fruta muestran una fuerte decoloración parda que se destaca en el fondo como se muestra en la **Figura 3**.

Para el uso industrial de berenjenas recién cortadas o el uso de berenjenas como producto fresco, debe evitarse el pardeamiento de la semilla. Para determinar la naturaleza bioquímica de la decoloración parda de los frutos cortados de berenjena, se observó la reacción de pardeamiento con y sin L-cisteína, que es un fuerte inhibidor de la polifenol oxidasa (PPO). El resultado de este análisis se muestra en la **Figura 4**.

El resultado mostrado en la **Figura 4** demuestra que la reacción de pardeamiento puede ser inhibida por el inhibidor de la PPO L-cisteína suministrado de manera exógena. Por lo tanto, la respuesta de pardeamiento está claramente mediada por PPO.

Con el fin de prevenir la decoloración parda en la berenjena causada por las semillas utilizando un enfoque genético, el material genético se escrutó para determinar la variación en la actividad PPO asociada a la semilla. Para ese propósito, se utilizó el método que se basa en la conversión de un sustrato, tal como L-DOPA, en un pigmento de color, tal como melanina.

Tras la incubación de las semillas de berenjena en una solución que contiene dihidroxifenilalanina (L-DOPA) como sustrato de PPO, la formación de melanina es claramente visible a medida que se produce una decoloración negra. Esta decoloración negra está mediada por PPO porque puede ser completamente inhibida por L-cisteína que se muestra en la **Figura 5**.

La decoloración de la semilla de la berenjena mediada por L-DOPA se utiliza para identificar material genético que ha reducido la actividad de PPO asociada a la semilla. Este escrutinio dio como resultado la identificación de material genético que muestra una reducción significativa de la actividad PPO asociada a la semilla. El resultado de tal escrutinio se ilustra en la **Figura 6**.

El material de berenjena que se ha tomado a través de este método de selección y que ha mostrado una fuerte reducción en la actividad de PPO asociada a la semilla se resume en la **Tabla 3**. En este escrutinio, algunas líneas de cultivo muestran una reducción considerable en la actividad de PPO asociada a la semilla (13, 14, 42, 49), mientras que otras muestran un fuerte pardeamiento (7, 27, 34, 47).

**Tabla 3**

Número	Línea/código de cultivo	Actividad PPO reducida
13	AB5480	+
14	AB5701	+
19	05N.1130-1	+
22	SNL.109	+
24	06N.1268-1	+
25	SNL.111	+
42	AB5028	+
49	AB5103	+
7	AB5261	-
27	06N.244-2	-
34	AB5007	-
47	AB5101	-

Al hacer cruces entre dos líneas que muestran esta reducción en la actividad de PPO asociada a las semillas, se obtienen híbridos que son más adecuados tanto para el uso industrial como para el mercado de productos frescos. Además, se han encontrado accesiones silvestres que están estrechamente relacionadas con la berenjena (19) o más distantes (22, 24, 25) y que muestran una reducción muy fuerte en la actividad de PPO asociada a la semilla. Estas

aciones se utilizan como inicio de un programa de retrocruzamiento que da como resultado líneas de cultivo e híbridos que son aún más adecuados tanto para fines industriales como de mercado de productos frescos. En el procedimiento de retrocruzamiento, el método de escrutinio mencionado anteriormente se utiliza para ayudar en la selección para determinar la mayor reducción en la actividad de PPO asociada a la semilla.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para someter a prueba una planta o parte de una planta para mostrar una decoloración de superficie reducida o ausente en comparación con una planta o parte de una planta de control, cuyo método comprende:

- 5 a) proporcionar una planta o parte de una planta que se obtiene de una población de plantas que muestra variación genética, en particular un banco de genes;
- b) crear una superficie de la herida en la planta o parte de la planta o incubar la planta o parte de la planta con un sustrato que se pueda convertir en un pigmento coloreado;
- c) incubar la planta o parte de la planta o las superficies de la herida creadas sobre ella para permitir que se produzca decoloración en la misma o sobre la misma;
- 10 d) observar la decoloración en o sobre las plantas o partes de la planta;
- e) comparar la decoloración observada con la decoloración que se observa en la planta o la parte de la planta de control para evaluar si la planta o la parte de la planta no muestra decoloración o una decoloración que se reduce en comparación con la planta o la parte de la planta de control; y
- 15 f) identificar una planta o parte de una planta que no muestra decoloración o una decoloración que se reduce en comparación con la planta o parte de la planta de control como planta que alberga el rasgo de decoloración superficial inducida por la herida reducida.

2. Método según la reivindicación 1, en donde la planta es

- una planta de hortaliza que se cultiva por sus hojas o partes del tallo, y se selecciona en particular entre lechuga, endibia, achicoria;
- 20 - una planta de hortaliza que se cultiva por sus tubérculos de raíz o tallo, y se selecciona en particular entre patata, batata, apio;
- una planta que tiene frutos que se cultiva por sus partes de fruta, y se selecciona en particular entre berenjena, manzana, plátano, aguacate, melocotón, pera, albaricoque y mango;
- 25 - una planta con flores que se cultiva por sus flores o partes de flores, y se selecciona en particular entre alcachofa, gerbera y crisantemo; o
- un hongo.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la planta pertenece a la familia *Asteraceae*, en particular al género *Lactuca* más en particular a la especie *Lactuca sativa*, o el género *Cichorium* y en particular a la especie *Cichorium intybus* y *Cichorium endivia*.

30 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la parte de la planta se selecciona entre hoja, cogollo, brote, raíz, tubérculo, tallo, flor, fruto, semilla, semilla germinada, o partes de la misma y células, y es en particular un disco de hoja o un disco de tejido de nervadura.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la incubación tiene lugar en un entorno acuoso, en particular papel de filtro humedecido o agua o una solución.

35 6. Método según la reivindicación 5, en donde el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre L-3,4-dihidroxifenilalanina, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, L-tirosina y catecol.

7. Método según la reivindicación 5 o 6, en donde

- 40 - la planta es manzana y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre ácido clorogénico (para analizar la carne), catecol, catequina (para analizar la piel), ácido cafeico, glucósidos de flavonol, 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), ácido 3,4-dihidroxibenzoico, p-cresol, 4-metil catecol, leucocianidina, ácido p-cumarico;
- la planta es albaricoque y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre ácido isoclorogénico, ácido cafeico, 4-metil catecol, ácido clorogénico, catequina, epicatequina, pirogalol, catecol, flavonoles, derivados del ácido p-cumarico,
- 45 - la planta es aguacate y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre 4-metil catecol, dopamina, pirogalol, catecol, ácido clorogénico, ácido cafeico, DOPA,
- la planta es plátano y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre 3,4-dihidroxifenil-etilamina (dopamina), leucodelfinidina, leucocianidina;

- la planta es berenjena y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cumarico, derivados del ácido cinámico,
  - la planta es lechuga y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre tirosina, ácido cafeico, derivados de ácido clorogénico,
  - 5 - la planta es mango y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre dopamina-HCl, 4-metil catecol, ácido cafeico, catecol, catequina, ácido clorogénico, tirosina, DOPA, p-cresol,
  - la planta es un hongo y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre tirosina, catecol, DOPA, dopamina, adrenalina, noradrenalina,
  - 10 - la planta es melocotón y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre ácido clorogénico, pirogalol, 4-metil catecol, catecol, ácido cafeico, ácido gálico, catequina, dopamina,
  - la planta es pera y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre ácido clorogénico, catecol, catequina, ácido cafeico, DOPA, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, p-cresol,
  - la planta es patata y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre ácido clorogénico, ácido cafeico, catecol, DOPA, p-cresol, p-hidroxifenilo, ácido propiónico, ácido p-hidroxifenil pirúvico, m-cresol,
  - 15 - la planta es batata y el entorno acuoso contiene un compuesto seleccionado entre ácido clorogénico, ácido cafeico, cafeilamida.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la planta de control es una planta en la que un disco de hoja cuando se incuba entre dos hojas de papel de filtro humedecido durante 7 días a 5 °C muestra una decoloración rosa alrededor de los bordes.
- 20 9. Método según la reivindicación 1, en donde el sustrato se selecciona de los compuestos enumerados en la reivindicación 7, y es en particular L-DOPA.
10. Método según la reivindicación 9 o 10, en donde la planta o parte de la planta se hierve antes de la incubación con el sustrato y se observa la decoloración de la herida o cerca de la herida.
- 25 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en donde la parte de la planta es una semilla, semilla germinada o disco de hoja.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la decoloración puede ser inhibida o revertida por L-cisteína.

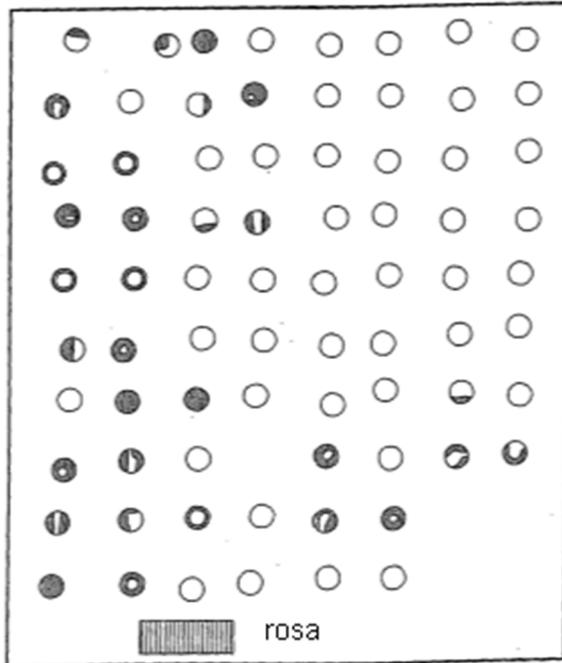
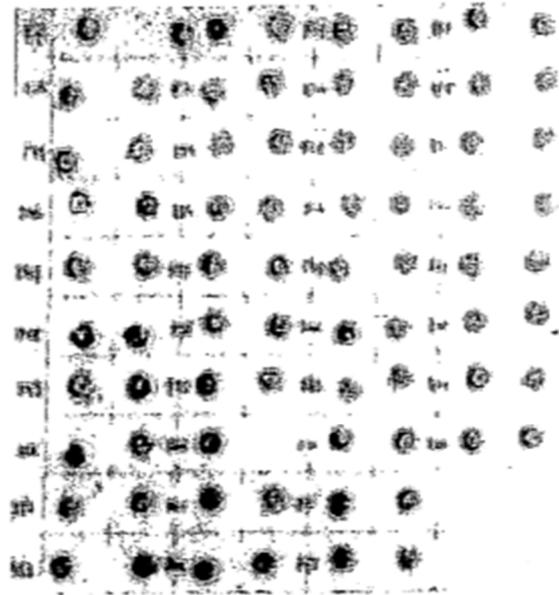


FIG. 1

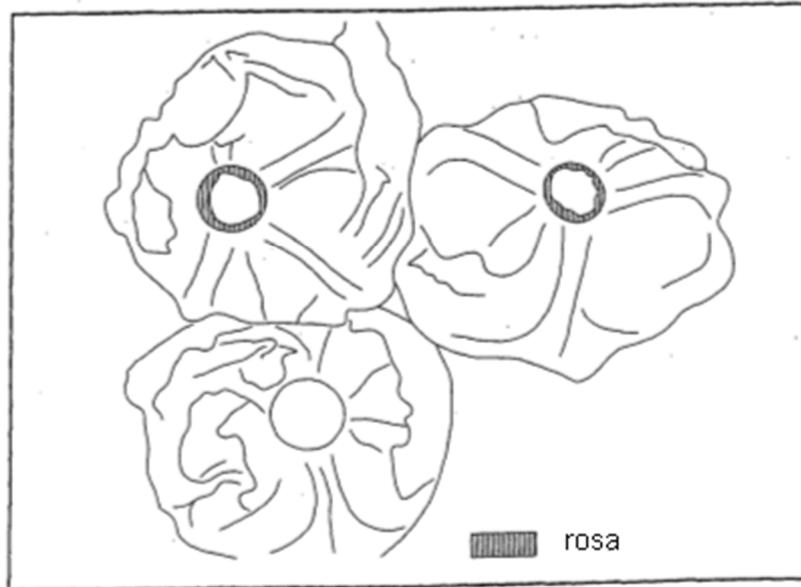


FIG. 2

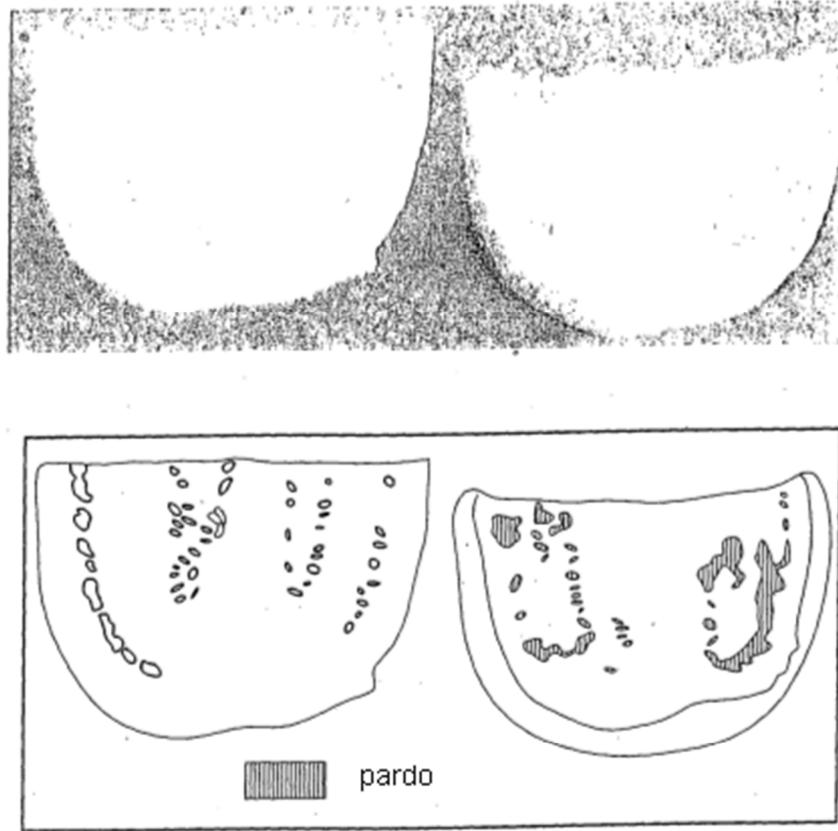


FIG. 3

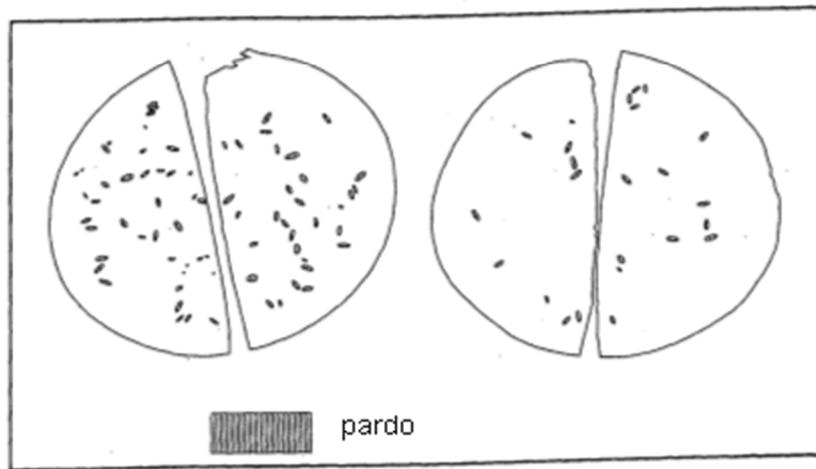
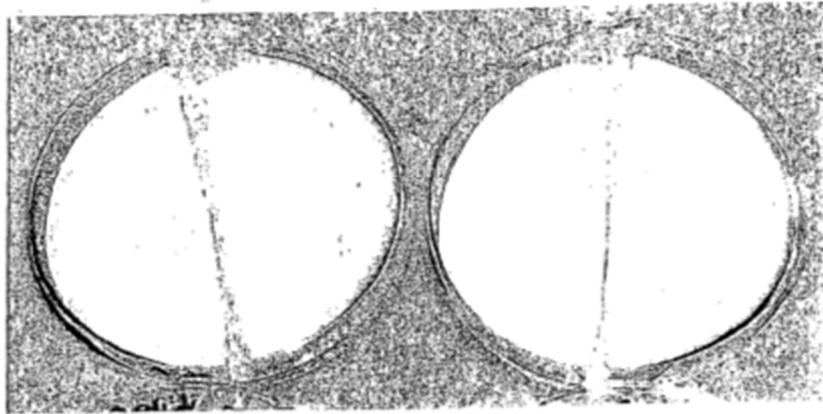


FIG. 4

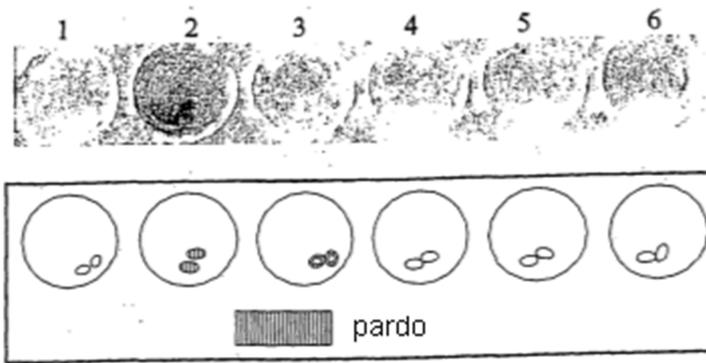


FIG. 5

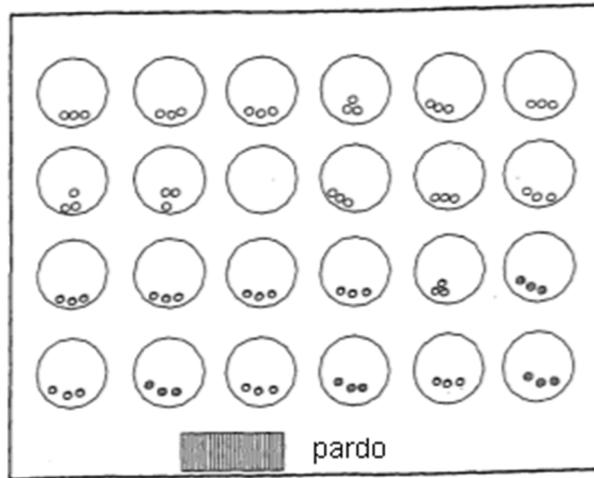
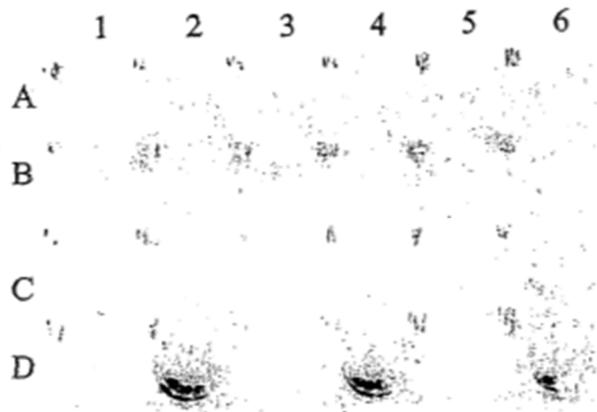


FIG. 6