

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 435**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 5/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2007 E 07702701 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1973396**

54 Título: **Método de cribado para la selección de plantas que muestran una reducida decoloración de superficie inducida por herida, 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:

17.05.2013

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:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 403 435 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 cribado para la selección de plantas que muestran una reducida decoloración de superficie inducida por herida, y planta y partes de planta así obtenidas.

Campo de la invención.

- 5 La presente invención se refiere a plantas y partes derivadas de las mismas, que muestran la ausencia o la reducción de decoloración de superficie inducida por herida, y a partes y progenie de las mismas.

Fundamentos de la invención.

- 10 Debido al crecimiento de la demanda, el procesamiento de productos frescos, en particular de la lechuga, se ha expandido de una forma considerable en los últimos años. La recolección y el procesamiento de lechugas implica un corte extenso de las hojas, que induce una fuerte respuesta a la herida. Esta respuesta a la herida lleva a un rápido deterioro del producto procesado. Este deterioro se manifiesta por una decoloración debida al pardeamiento (*browning*) o enrojecimiento (*pinking*) enzimático en la superficie de la herida y alrededor de la misma, la respiración y la desecación debidas a la transpiración. Especialmente el pardeamiento o enrojecimiento enzimático se considera de gran importancia, determinando directa o indirectamente la calidad global de la lechuga recién cortada
- 15 envasada.

Además, como consecuencia del deterioro, puede aumentar significativamente el número de microorganismos, lo que puede comprometer la seguridad alimentaria. La naturaleza altamente perecedera de las lechugas procesadas conduce a una intensa percepción por el consumidor de defectos del color, defectos del olor y defectos de la textura que está obstaculizando un crecimiento más rápido que el actual del llamado mercado de conveniencia.

- 20 Con el fin de inhibir el proceso de deterioro, se han desarrollado muchos tratamientos químicos o físicos posteriores a la recolección que se pueden aplicar para desacelerar el deterioro de la lechuga procesada.

- Entre estos tratamientos se encuentran el envasado de lechugas recién cortadas 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 se envasa lechuga recién cortada bajo una atmósfera de oxígeno reducido a bajas temperaturas, se puede reducir sustancialmente el pardeamiento enzimático. Sin embargo, tal ambiente modificado bajo en oxígeno da lugar a una respiración anaerobia, que crea un mal sabor y mal olor de los productos que se perciben como muy poco atractivos.
- 25

- Los recubrimientos comestibles son capas delgadas de materiales, que actúan como barrera de aislamiento físico y que protegen eficazmente al producto frente a diferentes formas de deterioro tales como la evaporación y el pardeamiento. Estos recubrimientos pueden hacerse por ejemplo de resinas, polisacáridos o proteínas.
- 30

- Se ha demostrado además que el pardeamiento de la lechuga recién cortada se puede impedir aplicando un breve choque térmico de 90 segundos a 45 °C, inmediatamente después del procesamiento. Posiblemente, el choque térmico desvía la biosíntesis de proteínas a partir de las enzimas implicadas en la decoloración hacia proteínas de choque térmico, reduciendo así la capacidad de pardeamiento enzimático. Alternativamente, el efecto del tratamiento de choque térmico sobre el pardeamiento puede explicarse por la termosensibilidad de las enzimas implicadas en la ruta de decoloración.
- 35

- Los productos químicos que pueden aplicar pueden ser por ejemplo agentes reductores como la vitamina C, agentes quelantes como EDTA, agentes complejantes como la ciclodextrina e inhibidores enzimáticos como la L-cisteína. La aplicación de productos químicos en alimentos frescos plantea evidentemente cuestiones de seguridad alimentaria y requiere la aprobación de la administración. Las combinaciones de las tecnologías posteriores a la recolección descritas anteriormente pueden ser consideradas pensadas y, finalmente, el procedimiento aplicado es un compromiso entre la eficacia tecnológica, el coste y la seguridad alimentaria.
- 40

- Al margen de la tecnología aplicada, la mejora de la calidad posterior a la recolección de la lechuga procesada tendrá un coste y por lo tanto existe en la técnica una evidente necesidad de proporcionar alternativas que eliminen o reduzcan la necesidad de aplicar tecnologías físicas o químicas posteriores a la recolección.
- 45

Sumario de la invención.

- El objeto de la presente invención es proporcionar plantas que muestren una reducida respuesta de decoloración inducida por herida y proporcionar plantas y progenie derivadas de las mismas que sean resistentes a los trastornos por el procesamiento posterior a la recolección, tales como el pardeamiento o el enrojecimiento enzimáticos. Es otro objeto de la invención proporcionar plantas que muestren una decoloración significativamente reducida de
- 50

pardeamiento o enrojecimiento al ser heridas. La decoloración al ser heridas puede ser también visible en partes de las plantas tales como tallos, semillas, frutas, hojas, flores, tubérculos, y brotes.

La invención proporciona por tanto una planta de lechuga que tiene una decoloración inducida por herida nula o reducida que puede obtenerse cruzando una planta con la NCIMB con número de registro 41459 o 41441 con otra planta de la misma especie y ensayando las plantas resultantes del cruce sometiendo las plantas o partes de las plantas a un cribado, que comprende:

a) crear una superficie herida en las plantas o partes de plantas que se van a someter a cribado y en las plantas o partes de las plantas testigo (de control);

b) incubar las superficies heridas para permitir que tenga lugar la decoloración en las mismas o sobre las mismas;

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

d) comparar la decoloración de la superficie herida observada en las plantas o partes de las plantas testigo para identificar las plantas o partes de plantas que no muestran decoloración o una decoloración que es reducida en comparación con la planta o parte de la planta testigo.

El método de cribado como se describe en el presente texto está destinado a identificar plantas que tienen una decoloración de superficie inducida por herida en una o más de sus partes o tejidos. Para el cribado, es por tanto muy práctico usar la parte o el tejido que son propensos a la decoloración. En la lechuga, esto puede ser la hoja o una parte de la misma, tal como una pieza obtenida con sacabocados.

El método es útil en particular para seleccionar plantas que pertenecen a la familia de las *Asteraceae*, en particular plantas del género *Lactuca* y más en particular a la especie *Lactuca sativa* que muestran una ausencia o reducción de la decoloración de superficie inducida por herida.

El método se lleva a cabo adecuadamente con partes de las plantas que tienen una superficie herida. Son muestras de ensayo muy útiles los discos que se obtienen con sacabocados a partir de una hoja, los llamados discos de hoja. Alternativamente, se puede utilizar el tejido del nervio central de vegetales foliosos veteados. Adecuadamente, se cortan discos de tales nervaduras.

La incubación tiene lugar adecuadamente en un entorno acuoso. El método puede ser llevado a la práctica muy bien con discos de hojas que se incuban en o entre papel de filtro humedecido. La respuesta de decoloración es entonces muy visible alrededor de los bordes de la herida en el papel. En el caso de plantas del género *Lactuca* la decoloración es la respuesta de enrojecimiento.

Alternativamente, el entorno acuoso comprende agua o una solución. En una realización específica que se ilustrará más adelante con mayor detalle 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 ellos, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, L-tirosina y catecol.

La invención se refiere a una planta que muestra una reducida decoloración de superficie inducida por herida, planta que puede obtenerse sometiendo una población de plantas al método de cribado de la invención y seleccionando las plantas de la población que no muestran decoloración de superficie en el cribado o muestran una decoloración de superficie en el cribado que es reducida en comparación con una planta de control o testigo.

La planta es una planta vegetal foliosa, más en particular una planta que pertenece al género *Lactuca sativa*.

Preferentemente la planta de la invención se identifica en el cribado y se elige subsiguientemente por tener una decoloración de superficie inducida por herida reducida o ausente, pero subsiguientemente es ensayada para determinar si tiene un hábito normal. Más en particular, la planta preferentemente no debe mostrar efectos pleiotrópicos negativos.

De acuerdo con la invención se identificaron y se seleccionaron plantas que no muestran, o no lo hacen de forma significativa, decoloración de superficie inducida por herida reducida. La progenie de semillas de estas plantas fueron depositadas en la NCIMB y se les ha dado el número de entrada que se expone en la Tabla 1. Se dan detalles acerca de la descendencia de semillas de los depósitos en el Ejemplo 4 y en el Ejemplo 6. Estos depósitos se hacen porque tienen la característica específica individual de la no decoloración, o de una decoloración inducida por herida significativamente reducida. No fueron ensayadas por criterios DUS para registro de variedad, es decir distinguibilidad, uniformidad, estabilidad en todas las características de registro, y no se espera que cumplan estos criterios en modo alguno.

Tabla 1

Planta nº	Referencia interna (= referencia NCIMB)	Número de entrada NCIMB	Fecha del depósito
06D.210202	06D.86382	41454	3 de enero 2007
05D.202539	07G.9979	41441	10 de octubre 2006

- 5 La invención se refiere además a plantas que tienen una decoloración de superficie inducida por herida reducida o ausente y que pueden obtenerse cruzando una planta de la invención con otra planta de la misma especie. La característica de "decoloración de superficie inducida por herida reducida o ausente" puede así llevarse a otras plantas que originalmente no tienen tal característica. El hecho de si las plantas que resultan de tal cruce son realmente plantas de la invención puede ensayarse sometiendo a estas plantas al método de cribado de la invención. Preferiblemente las plantas que se seleccionan como plantas de la invención se ensayan también para ver si tienen un hábito normal.
- 10 La invención se refiere además a la progenie de una planta progenitora de la invención que conserva la ausencia o la reducción de la decoloración de las hojas inducida por herida como se encuentra en la planta progenitora. Tal progenie puede estar muchas generaciones separadas de la progenitora. Siempre y cuando se mantenga la característica de "decoloración de la superficie inducida por herida reducida o ausente", la planta es una planta de la invención.
- 15 La invención se refiere además a partes de las plantas de la invención. Las partes de plantas como las cabezas u hojas de lechuga o de endibia son normalmente las partes que tienen una superficie de corte que puede ser sujeto de la decoloración.
- 20 Las partes de plantas de la invención pueden ser usadas en el cultivo de tejidos para regenerar plantas que conservan la ausencia o reducción de la decoloración de las hojas inducida por herida como se encuentra en la planta a partir de la cual se deriva el tejido para el cultivo de tejidos. Tales plantas regeneradas son también parte de esta invención.
- 25 La invención se refiere además a semillas de una planta de la invención. A partir de las semillas pueden cultivarse plantas que también tienen la característica de "decoloración de la superficie inducida por herida reducida o ausente". Puede comprobarse si las semillas y por lo tanto las plantas cultivadas a partir de las mismas han mantenido o no esa característica en el método de cribado de la invención. La invención se refiere también a semillas de otras generaciones que mantienen la ausencia o la reducción de la decoloración de las hojas inducida por herida como la que se encuentra en las semillas originales.
- 30 La invención es muy interesante comercialmente para el mercado de verduras procesadas. Como se explicó anteriormente, la decoloración de productos, en particular de frutas y verduras frescas, se considera no deseable ya que el producto decolorado es rechazado por el consumidor. La característica de "decoloración de superficie inducida por herida reducida o ausente" de la invención es por tanto adecuada si se encuentra en productos vegetales procesados, como lechuga, endibia o endibia belga cortada o combinaciones de los mismos. Cuando se someten a cribado usando el método de la invención, las verduras procesadas de la invención no muestran decoloración de las hojas inducida por herida, o es tan sólo limitada.
- 35 lechuga, endibia y la endibia belga procesadas, que cumplen el cribado son parte de la invención, ya que se ha demostrado que tienen una modificación que da lugar a un reducido flujo metabólico dependiente de PAL y / o PPO.

Descripción detallada de la invención.

- 40 Cuando la lechuga es recolectada y procesada por corte, se generan muchas superficies heridas en la hoja lo que conduce a una respuesta significativa de la planta o de partes de la planta, manifestada por una decoloración marrón o rosa en o adyacente a la superficie de la herida. También se puede observar enrojecimiento en sitios distantes de la superficie de la herida en el nervio central de la hoja, así como el extremo. A veces también se puede observar el enrojecimiento en etapas precisamente antes de la recolección que se considera que es debido al estrés abiótico o exceso de madurez de la cosecha.
- 45 Las diferentes formas de decoloración son efectuadas por actividad enzimática, que está fuertemente potenciada como consecuencia de la herida y que genera diversas formas de polifenoles y productos de reacción derivados de los mismos.

Una importante actividad enzimática implicada en la reacción de pardeamiento es la PPO. La actividad de la PPO en relación con el pardeamiento enzimático no está restringida a la lechuga sino que ha sido descrito para otras muchas especies de plantas por estar implicada en el deterioro posterior a la recolección como en la manzana, el plátano y la patata. De hecho la PPO es ampliamente reconocida como una de las enzimas más importantes implicadas en el deterioro posterior a la recolección de muchas frutas y verduras frescas procesadas.

Por esta razón la PPO ha sido el objetivo de muchas tecnologías que apuntan a la reducción o la prevención de su actividad con el fin de aumentar la calidad post-recolección de productos alimenticios. La PPO cataliza una reacción en la que los polifenoles que residen en el tejido de la planta son oxidados para dar lugar a la formación de o-quinonas. Subsiguientemente, reacciones enzimáticas y no enzimáticas conducen a la formación de pigmentos marrones o negros.

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

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

El nivel de la enzima PPO no se induce específicamente al herir los tejidos de la planta sino que reside inactivamente en el cloroplasto. Al tener lugar la herida el PPO se activa lo que se manifiesta por el hecho de que el sustrato fenólico que reside en las vacuolas se pone en contacto con el PPO debido a la rotura del tejido.

En la lechuga, la producción de polifenoles, que son el sustrato de la PPO, se induce al tener lugar la herida. Por consiguiente, el potencial de pardeamiento del tejido de la lechuga no parece estar limitado por la cantidad de PPO en el tejido de la hoja, sino más bien por la velocidad de la biosíntesis de polifenol al tener lugar la herida.

En relación con esto, la situación puede diferir entre cosechas. Por ejemplo, en la manzana la cantidad de polifenoles es suficiente para generar una respuesta de pardeamiento de las frutas dentro de una hora después de la herida, mientras que en la lechuga la reacción de pardeamiento puede llevar unos pocos días debido al hecho de que en la lechuga el conjunto de polifenoles necesita en gran medida ser sintetizado de nuevo al tener lugar la herida.

La síntesis de polifenoles tiene lugar a través de una ruta bioquímica bien caracterizada llamada ruta del fenilpropanoide. La primera etapa de esta ruta es catalizada por la enzima fenilalanina amonio 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 ruta del shikimato en ácido cinámico.

En la lechuga, la herida de las hojas conduce a una fuerte inducción de la expresión del gen PAL y la actividad de PAL. La formación de polifenoles está correlacionada con esta actividad enzimática, lo que sugiere que la actividad de PAL inducida por la herida de la lechuga es un factor importante responsable del pardeamiento (Campos, R. et al. (2004) *Physiologica Plantarum* 121, 429-438 y las referencias citadas en la misma). Sin embargo, actualmente no está claro qué otros factores determinan el resultado final de la reacción de decoloración inducida por herida. Por ejemplo, se ha sugerido que la actividad de las peroxidasas (POD) es importante también en el establecimiento del nivel de decoloración final (Fukumoto, L. R. et al (2002) *J. Agric Food Chem.* 540, 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, puede ser limitada la contribución de POD a la decoloración.

Además es evidente que la formación de la herida es percibida de alguna forma por la planta y subsiguientemente se genera una señal a través de una cascada, que actualmente está poco definida para la lechuga. Parece obvio que estas actividades se orientarán principalmente hacia la cicatrización de la herida y la defensa contra los agentes patógenos. Por consiguiente, es probable que estén implicados muchos factores genéticos en el montaje 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 herida.

La mayoría de estos factores genéticos son actualmente desconocidos y para aquellos de los que se sabe que están implicados no está claro hasta qué punto estos factores juegan 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.

Por ejemplo, aunque se considera que la actividad de PAL inducida por herida es determinante del nivel de pardeamiento de la lechuga, se sabe que hay productos de la ruta del fenil propanoide que están implicados, entre

otras cosas, en la biosíntesis de la pared celular o también en la respuesta de defensa. Por consiguiente, la reducción de la actividad de PAL inducida por herida con el fin de reducir el potencial de pardeamiento puede comprometer otras funciones además del pardeamiento inducido por herida por que pueden ser menos deseables en relación con otros aspectos del cultivo de la lechuga.

5 Del mismo modo, la actividad de PPO se ha atribuido como implicada en la respuesta de defensa y por consiguiente la reducción del potencial de pardeamiento reduciendo los niveles de PPO puede hacer que aumente la susceptibilidad a los agentes patógenos (Thipyapong, P. et al (2004) Planta 220, 105-117). Por consiguiente, los presentes inventores razonaron que un planteamiento sin prejuicios puede tener más éxito en este aspecto. Tal planteamiento comprende las etapas siguientes:

10 1. Generación de una población de plantas variante, en particular una población mutante. Tal población mutante puede ser generada por tratamiento de semillas o de tejidos de plantas con agentes mutagénicos tales como el metano sulfonato de etilo (ems) o los rayos X.

2. La puesta a punto de un cribado fenotípico eficiente en el que la selección se basa en una decoloración inducida por la respuesta a la herida de la planta, en particular una verdura foliosa, más en particular, lechuga, endibia o endibia belga, que se canaliza a través de PAL y / o PPO.

3. Caracterización de los mutantes modificados en su respuesta a la herida en relación con el potencial de decoloración posterior a la recolección y la ausencia de efectos pleiotrópicos de la modificación, que comprometen el cultivo y procesamiento de la planta, en particular una verdura foliosa, más en particular, lechuga, endibia o endibia belga, de acuerdo con la práctica común.

20 Se describe en el presente texto un método de cribado imparcial para identificar, seleccionar y obtener una planta que muestra una decoloración inducida por herida y trastornos de procesamiento después de la recolección reducidos, tales como pardeamiento o enrojecimiento enzimático.

También se describe un método más sesgado que usa un sustrato que se convierte en un pigmento por la PPO. En este ensayo, el cribado es específicamente para mutantes de PPO. Un sustrato adecuado es la L-DOPA, que se convierte en el pigmento negro melanina.

El método se ilustra en el presente texto en referencia a verduras foliosas, como la lechuga, pero también puede ser llevado a la práctica de la misma forma con otras plantas, como se indica anteriormente.

La invención se refiere a plantas o partes de plantas con genotipos alterados, las cuales plantas o partes de plantas muestran una susceptibilidad reducida hacia trastornos fisiológicos del procesamiento posterior a la recolección, tales como pardeamiento o enrojecimiento enzimático. 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 trastornos de procesamiento posterior a la cosecha, tales como pardeamiento o enrojecimiento enzimático, y se encuentra en el genoma de una planta de lechuga.

La progenie de las plantas como se reivindica es también parte de esta invención. Se pretende que "progenie", como se usa en el presente texto, abarque todas las plantas que tienen la misma o una susceptibilidad reducida similar hacia los trastornos de procesamiento después de la recolección, en particular el pardeamiento o enrojecimiento enzimático, como las plantas originales descritas en el presente texto y que se derivan de las mismas en cualquier forma, tal como por reproducción sexual, similar a la autofertilización o fecundación cruzada con otra planta del mismo género, o la reproducción vegetativa, tal como el corte, cultivo de tejidos, cultivo haploide, cultivo de protoplastos, fusión de protoplastos, u otras técnicas. Tal progenie es no sólo la primera generación de plantas derivadas por una o más de estas técnicas, sino también cada generación posterior de plantas derivadas por una o más de estas técnicas, siempre y cuando las plantas derivadas tengan la susceptibilidad reducida.

Para llevar a cabo el cribado fenotípico de la invención, debe ser generada una superficie herida ya que la reacción enzimática de decoloración se induce por herida. La herida es la alteración irreversible de la estructura natural de la planta, tejidos y/o células por métodos tales como corte, punzamiento, recorte, abrasión, aplastamiento, rotura, pelado, trituración, prensado, rasgado, molienda, inyección de fluido, choque osmótico, separación, siega, fragmentación, roce y lagrimeo.

Subsiguientemente, ha de ponerse de manifiesto una característica fenotípica que es diagnóstico para la ruta que conduce a la decoloración del tejido y que se puede utilizar muy eficientemente en un cribado de la población mutante.

Sorprendentemente, se encontró que tales características fenotípicas pueden obtenerse tomando partes de la hoja de plantas de lechuga e incubándolas bajo condiciones muy específicas que favorecen que se produzcan diferentes

formas de decoloración de superficie por herida. Subsiguientemente, se pueden aplicar tales ensayos a gran número de plantas mutantes con el fin de seleccionar aquellas plantas que muestran una reducción de la respuesta de decoloración inducida por herida.

Una realización del método utilizado para seleccionar plantas de la presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que cuando se toman discos de hojas, en particular de hojas de lechuga, y se incuban entre papeles de filtro húmedos a 5 °C, después de aproximadamente 4 días se hace evidente la formación de un colorante rosa en los bordes de los discos de hojas. Un papel de filtro adecuado es el papel de filtro de tipo 1450 CV, No. de referencia 10 313 281 de Schleier & Schuell, Microscience GmbH, Dassel, Alemania. Al tener lugar una incubación adicional, la señal se intensifica y después de aproximadamente una semana se ha alcanzado la intensidad máxima. La formación del colorante rosa ocurre específicamente en superficies heridas.

La decoloración se puede medir puntuando en una escala visual de 0, que significa la ausencia de pardeamiento o enrojecimiento, a 10, que significa pardeamiento y enrojecimiento igual que una variedad de lechuga estándar (*L. sativa*). En el presente ejemplo la variedad "Troubadour" de *L. sativa* se utiliza como patrón para 10. Si se desea, se pueden utilizar imágenes de comparación para puntuar las clases intermedias entre 0 y 10. Además, pueden hacerse imágenes digitales del papel de filtro con el colorante rosa, seguido por recuento por posición de disco de hoja del número de píxeles con un color rosa intenso. Utilizando una de estas medidas pueden llevarse a cabo análisis estadísticos simples tales como la prueba de la t, bien conocida por los expertos en la técnica, para establecer si una planta o un grupo de plantas está significativamente menos enrojecida que el patrón, como cv. "Troubadour". El nivel de significación aplicado de una prueba unilateral es 0,001.

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 de su descendencia.

Además, se ha demostrado que se puede obtener una respuesta de decoloración inducida por herida usando muchos tipos diferentes de tejidos de hojas de diferentes etapas de desarrollo. Por ejemplo, el tejido del nervio central puede ser inducido también para dar respuesta a la herida. Cuando se aplica a diferentes tipos de lechugas, tales como la butterhead o mantecosa, la iceberg, la lechuga cos o francesa, la batavia la hoja de roble, no se encontraron accesiones individuales que mostrasen un enrojecimiento significativamente menor que el resto de la población investigada.

Se demostró además que un inhibidor específico de la PPO, L-cisteína, cuando se aplica durante la reacción, suprime fuertemente la formación del colorante rosa. Además, se encontró que la formación del colorante rosa era inhibida por el cinamaldehído, que es un inhibidor de la actividad de PAL y 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 rosa de la lechuga es dependiente de PAL y PPO.

Se sabe que el pardeamiento enzimático de la lechuga recién cortada se evita muy eficazmente mediante la aplicación de un breve choque térmico. El efecto observado puede explicarse suponiendo un nuevo planteamiento de la ruta de la biosíntesis de proteínas desde la ruta del fenilpropanoide hacia proteínas de choque térmico reduciendo así el flujo metabólico hacia la formación de polifenoles.

Alternativamente, el efecto puede explicarse suponiendo que las enzimas implicadas en la oxidación del polifenol, tales como PPO y POD, son inactivados por el tratamiento de choque térmico. Cuando se aplica el choque térmico a la lechuga, que subsiguientemente se ensaya en cuanto a la respuesta de enrojecimiento, se ha demostrado que esta respuesta, como el pardeamiento enzimático, era eficazmente inhibida. Esto demuestra que la respuesta de enrojecimiento de la lechuga, que es parte de esta invención, es fisiológicamente muy similar a la bien conocida respuesta de pardeamiento enzimático.

Este hallazgo fue confirmado mediante la aplicación de L-cisteína como agente reductor. Se sabe que la L-cisteína, además de ser un inhibidor de la PPO, reacciona también con o-quinonas coloreadas y las convierte de nuevo en difenoles incoloros en una reacción de reducción química. Cuando se trata el colorante rosa formado por los discos de hoja de lechuga con L-cisteína, se demostró que el compuesto rosa se convertía en un compuesto incoloro. Por tanto, parece probable que el colorante de color rosa es una o-quinona formada por PPO.

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

Además, cuando las plantas que se recogen del campo y que muestran enrojecimiento, son tratadas con L-cisteína, también se elimina la decoloración de color rosa. Esto demuestra que la respuesta de enrojecimiento del disco de hoja está representando el fenómeno de enrojecimiento que tiene lugar de forma natural, que a veces puede verse en las plantas que crecen bajo condiciones de campo.

La invención se ilustra mediante el siguiente experimento. Se producen partes de una hoja de lechuga de una cabeza cortándolas y se incuban a 16 °C en aire. Como respuesta la superficie herida se pone marrón después de aproximadamente 4 días. Especialmente en la superficie herida de la vena principal puede ser claramente observado el pardeamiento. Además, la reacción de pardeamiento puede también ser observada en el nivel de planta completa al dañar las hojas mediante corte o abrasión.

Todas estas reacciones de pardeamiento pueden ser inhibidas completamente por L-cisteína, un inhibidor de PPO, lo que demuestra que estos fenotipos se manifiestan a través de la actividad de PPO y por consiguiente se puede considerar diagnóstico para el pardeamiento posterior a la recolección como se observa durante el procesamiento y envasado de la lechuga.

Estas reacciones de pardeamiento inducidas por herida se pueden generar de una manera eficiente que puede ser aprovechada en un procedimiento de cribado fenotípico para identificar plantas mutantes que tienen potencial de pardeamiento inducido por herida reducido.

Otro método descrito en el presente texto se basa en la decoloración en superficies heridas de tejidos de lechuga, inducida aplicando sustratos que pueden ser convertidos en compuestos coloreados por las enzimas oxidantes del fenol.

Por ejemplo, cuando los discos de hojas de lechuga se incuban con el sustrato de la PPO L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), se observa una decoloración de marrón oscuro a negro en la superficie herida que es la manifestación de la formación de melanina a través de la PPO. Cuando se aplicó simultáneamente L-cisteína, la decoloración negra se inhibió completamente lo que confirma la suposición de que esta decoloración está mediada por la PPO.

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

De manera similar a la descrita para la L-DOPA se pueden aplicar otros sustratos para producir una respuesta de decoloración. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, L-tirosina, y catecol.

En su conjunto, la formación de los diversos colorantes en superficies heridas generadas en plantas monitoriza modificaciones en una ruta que empieza por la inducción de una señal de herida, canalizada a través de PAL y PPO y que lleva a la decoloración. Como se ha descrito, estas reacciones de decoloración inducida por herida pueden ser fácilmente evaluadas por inspección visual lo que permite un procedimiento de cribado de mutantes muy eficiente. La base subyacente al método descrito por esta invención se ilustra en la Figura 1.

De acuerdo con esta invención, se ha encontrado por tanto que la ruta de decoloración inducida por herida de discos de hoja *in vitro* se solapa en gran medida con la decoloración inducida por herida de la lechuga procesada a escala industrial y por lo tanto se puede considerar diagnóstico para este proceso. Esto está confirmado por la noción de que los inhibidores de PAL o PPO inhiben el pardeamiento enzimático de la lechuga procesada y envasada bajo condiciones industriales prácticas. Es importante el hecho de que como el procedimiento comprende la etapa de inducción, esto es de herida, y una de las conversiones metabólicas finales mediadas por la PPO, el procedimiento permite capturar todos los factores genéticos directa o indirectamente involucrados en este proceso fisiológico. Además, como esta respuesta puede ser generada usando una gama completa de tejidos de hoja o de hojas en diferentes etapas de desarrollo, los cribados de mutantes pueden ser apuntados hacia estas diferentes etapas o tejidos cuando se considere relevante.

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

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

En el caso de mutaciones recesivas estas dos posibilidades se pueden distinguir fácilmente llevando a cabo pruebas de alelismo, que comprenden cruzar las dos plantas mutantes y determinar el fenotipo del híbrido. En caso de alelismo de las mutaciones, el rasgo de decoloración reducida será evidente en la F1, mientras que en caso de que el fenotipo de los mutantes se determine por diferentes loci recesivos, esto no será el caso.

Como se aplicó mutagénesis aleatoria para generar la población de partida, las mutaciones en la base genética pueden contribuir también a la variación del fenotipo bajo las condiciones experimentales. Con el fin de discriminar entre mutaciones individuales de diferentes intensidades y un efecto combinado de las mutaciones en la base

genética, se deben realizar retrocruzamientos para crear fondos genéticos uniformes para los diferentes eventos de decoloración reducida.

Tal procedimiento es más relevante con el fin de determinar si las mutaciones en loci específicos implicados en la decoloración inducida por herida muestran efectos pleiotrópicos.

- 5 Las plantas M2 así seleccionadas sobre la base de una respuesta de decoloración reducida se usan para cultivar semillas M3. Subsiguientemente, las líneas creadas que descienden de los eventos de decoloración reducida son reevaluados en relación con su respuesta a la herida reducida. Además, puede evaluarse el pardeamiento o enrojecimiento reducido en diferentes fondos genéticos y bajo diferentes condiciones de cultivo y procesamiento.

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

- 15 Aunque la mutagénesis inducida es el método preferido a usar en esta invención, las personas expertas en la técnica saben que existe una tecnología que permite modificar 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.

- 20 Otro planteamiento es modificar dianas génicas mediante la recombinación homóloga o el direccionamiento de genes. Usando este planteamiento, un fragmento de un gen es intercambiado por un fragmento de DNA introducido que contiene una modificación deseada. También son factibles enfoques transgénicos en los que se introducen genes diana modificados que compiten con el producto endógeno. Esto puede conducir a efectos negativos dominantes. Además la regulación por defecto específica de la expresión de genes es factible a través de la interferencia de RNA.

- 25 En el caso de que se utilicen oligonucleótidos mutagénicos, direccionamiento génico o planteamientos transgénicos para modificar un factor genético implicado en la respuesta de decoloración inducida por herida, obviamente, debe ser conocida la estructura primaria de los genes relevantes.

- 30 Esta invención se refiere a mutantes de lechuga y a la progenie derivada de los mismos que fueron identificados sobre la base de la decoloración rosa inducida por herida de discos de hojas de lechuga. La aplicación de este ensayo de enrojecimiento a plantas de una población M2 que contienen mutaciones aleatorias inducidas por ems tuvo como resultado la identificación de cierto número de mutantes, que mostró una reducción significativa de la respuesta de enrojecimiento en comparación con las plantas testigo, que no contienen las mutaciones inducidas por ems.

- 35 La mayor parte de tales mutantes mostraron un fenotipo enano y con frecuencia 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 similares a las plantas testigo.

Cuando plantas de la progenie de este mutante particular cultivado a partir de semillas obtenidas por autofertilización se ensayan en relación con el enrojecimiento, se observa una reducción similar a la que se ha encontrado para el mutante identificado originalmente. Esto demuestra que una respuesta de decoloración rosa reducida puede ser heredable y causada por una modificación del genoma.

- 40 Otro sorprendente hallazgo fue el hecho de que cuando las plantas de la progenie se cultivan hasta la madurez y se ensayan en relación con el pardeamiento enzimático del tejido herido de la nervadura central, esta respuesta está también fuertemente inhibida.

- 45 Esto demuestra que el ensayo de enrojecimiento de disco de hoja está relacionado causalmente con el pardeamiento enzimático en la lechuga y que el ensayo de enrojecimiento se puede utilizar para predecir el nivel de pardeamiento enzimático de una planta de lechuga madura.

- 50 Por lo tanto, el ensayo de enrojecimiento de disco de hoja se puede utilizar como una herramienta de selección para identificar las plantas de lechuga con un potencial de pardeamiento enzimático reducido. Dicha herramienta puede ser utilizada para identificar las plantas de lechuga con un reducido potencial de pardeamiento enzimático a partir de cualquier tipo de población de plantas al margen de la causa de la variación genética, que reside en tal población. Por ejemplo, además de las poblaciones de ems, se pueden usar accesiones naturales o poblaciones de cría.

Uno o más de los métodos de cribado descritos en el presente texto se puede aplicar a cualquier especie vegetal foliosa para la que se necesite mejorar la calidad del tratamiento posterior a la recolección.

La característica fenotípica de la presente invención puede ser detectada en una planta llevando a cabo uno de los métodos de cribado que se describen en el presente texto. Plantas de la invención son aquellas plantas que, en comparación con una planta testigo, muestran la ausencia o una reducción de la decoloración de superficie inducida por herida. La presencia de la característica se determina por medio de una o más de tres pruebas de decoloración, que son la aparición de enrojecimiento o pardeamiento o la capacidad para 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 es por lo menos reducida en comparación con un testigo.

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

La presente invención se ilustrará con más detalle en los Ejemplos que siguen y que no se pretende que limiten la invención en modo alguno. En los Ejemplos se hace referencia a las figuras siguientes.

Figura 1: Descripción esquemática de las razones tras del diseño del procedimiento de cribado de mutantes de poblaciones de lechuga para la reducción de la decoloración enzimática posterior a la recolección. La señal de entrada del cribado es la formación de una herida del tejido de la hoja, que es detectada por la planta y que genera una respuesta de señalización divergente que conduce a cierto número de procesos fisiológicos incluyendo senectud, respiración y decoloración del tejido. Esta señal de entrada puede combinarse con la aplicación de compuestos fenólicos como sustratos de PPO.

La señal de salida del cribado es una decoloración marrón o rosa, que depende de las condiciones aplicadas, del diagnóstico de la superficie herida para pardeamiento y enrojecimiento posterior a la recolección. Esto se infiere del hecho de que la señal de salida se inhibe completamente 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 cribado basada en la decoloración rosa de discos de hoja. Discos de hoja de plantas de lechuga (1 disco por planta) se disponen entre papeles de filtro húmedos y se incuban a 5 °C durante 7 días. Puede ser claramente observada una decoloración color rosa alrededor de cada disco de hoja en la superficie de herida.

Figura 3: El ensayo de enrojecimiento del disco de hoja (4 discos por plato) llevado a cabo en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de PAL cinamaldehído. El número encima de cada plato muestra el % de cinamaldehído usado.

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

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

Figura 6: El efecto del pretratamiento por choque térmico sobre el enrojecimiento de discos de hoja de lechuga. El choque térmico se aplicó durante 90 segundos en hojas intactas a la temperatura indicada en cada plato.

Figura 7: Conversión en un compuesto incoloro del colorante rosa formado por la respuesta de la lechuga a la herida por L-cisteína. La fila superior de platos muestra el ensayo de L-DOPA, mientras que la fila inferior de platos muestra el ensayo de enrojecimiento. El inferior de los dos discos en cada plato fue tratado con L-cisteína después haberse completado la respuesta a la herida. Los valores de la concentración de L-cisteína usada son 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 mM, que se indica anteriormente.

Figura 8: Reducción por L-cisteína del enrojecimiento en lechuga cultivada. El panel superior muestra los síntomas típicos de enrojecimiento de una hoja de lechuga tomada de una planta, que se sometió a estrés extremo por anegamiento. Las venas principales muestran la presencia de un colorante rosa. 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 individuales de lechuga M2 (agrupadas en grupos) en relación con la decoloración del disco de hojas de acuerdo con el método descrito por la presente invención. En este panel se muestra un total de 138 muestras de entre 12000 de las cuales la indicada por una flecha mostró una decoloración de enrojecimiento fuertemente reducida. Panel B: El reensayo del individuo seleccionado indicado en el panel A confirmó la casi total ausencia de formación de la decoloración rosa (muestra en la posición del medio) en comparación con muestras de control que muestran una clara respuesta decoloración.

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

Figura 11: Ensayo de la progenie de un mutante de lechuga que muestra una decoloración reducida. A la izquierda se exponen 25 muestras de control que muestran una respuesta normal de decoloración inducida por herida. A la derecha, se expone un grupo de muestras que se toma de una serie de 35 progenies de plantas derivadas de un mutante único, que se reduce en gran medida en su respuesta decoloración inducida por herida.

Figura 12: Imagen representativa del fenotipo de salida del cribado basado en la decoloración parda de las partes de nervadura central de hojas tomadas de plantas de lechuga maduras. La imagen muestra discos de tejido de nervadura central de la hoja externa de lechuga después de la incubación durante 3 días a 16 °C. El cambio de color típico puede ser observado claramente en la superficie de la herida. Cada plato contiene 3 discos tomados de diferentes posiciones de la nervadura central (verde, verde claro y blanco). El número sobre el plato indica la concentración mM de L-cisteína, que fue añadida 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 1,5 mM de L-DOPA. El tubo superior es el testigo negativo, los otros 3 tubos son idénticos. El panel B muestra el resultado de la incubación de discos de hoja entre papeles de filtro húmedos, que contienen 1,5 mM de L-DOPA.

Figura 14: Ensayo de la progenie de un mutante de lechuga que muestra una reducida decoloración rosa inducida por herida en el pardeamiento de la nervadura central. El panel A muestra los discos de nervadura central de 8 plantas de la progenie, numeradas del 1 al 8 (3 discos por planta) del mutante de pardeamiento reducido. El panel B muestra los discos de nervadura central de 8 plantas testigo numeradas de 9 a 16 (3 discos por planta), que muestran una respuesta normal de pardeamiento.

Figura 15: Evaluación de un mutante de lechuga que muestra una reducida decoloración de enrojecimiento inducida por herida o respuesta de pardeamiento después del corte y envasado bajo la atmósfera ambiente. Los trozos de hoja de la cabeza de una planta testigo se muestran a la izquierda y los trozos de hoja del mutante de decoloración reducida se muestran a la derecha. El material de hoja recién cortada se almacenó durante 6 días a 4 °C. La decoloración parda se puede observar claramente en las muestras testigo mientras que las muestras de mutante permanecen sin cambios.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Modificación genética de la lechuga usando ems.

Aproximadamente 2000 semillas de las variedades de lechuga Troubadour, Apache, Yorvik y Roderick se incubaron en una solución aireada entre 0,05% (p/v) o 0,07% (p/v) de ems durante 24 horas a temperatura ambiente. Después del tratamiento con ems las semillas M1 fueron enjuagadas con agua y plantadas en un invernadero a 20 °C con un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad para desarrollar las plantas maduras e inducir la fructificación prematura y la floración con el fin de producir semillas M2. Después de la maduración, se recolectaron las semillas M2, se agruparon y se almacenaron para usarlas más adelante. La frecuencia de mutación se estimó sobre la base del número relativo de las plantas individuales con un fenotipo blanqueado que son alteradas en la biosíntesis de clorofila.

Ejemplo 2

Desarrollo de un diagnóstico de cribado fenotípico para la decoloración de lechuga inducida por herida basado en la formación de pigmento rosa.

Se desarrolló un ensayo fenotípico en el que puede ser fácilmente evaluada la decoloración de la hojas de lechuga inducida por herida. Este planteamiento permite el cribado de plantas jóvenes en relación con la decoloración. Se tomaron discos de hoja de 5 mm de diámetro de plantas jóvenes o maduras y se pusieron 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 rosa en el sitio herido del disco de hoja que se hizo claramente visible en forma de un círculo impreso sobre el papel de filtro (Figura 2).

Con el fin de demostrar que la producción de colorante rosa requiere una ruta de fenilpropanoide activa, en este ensayo fueron evaluados los efectos de los inhibidores de la PAL (cinamaldehído, Figura 3) y la PPO (L-cisteína, Figura 4). Cuando se aplicó cinamaldehído durante el ensayo, la decoloración rosa fue inhibida completamente a una concentración de 0,01% o superior.

Un resultado similar fue obtenido utilizando L-cisteína a una concentración de 0,001% y superior, mientras que otros aminoácidos tales como la L-leucina o la L-alanina no mostraron efecto alguno. Esto demuestra que la L-cisteína puede inhibir la respuesta de enrojecimiento de los discos de hoja de lechuga y que el efecto inhibitor de la L-cisteína es específico.

Con el fin de demostrar que la L-cisteína está actuando realmente como 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 no se considera que la L-DOPA sea un sustrato natural para la PPO de la lechuga, se observó una decoloración de color marrón 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 aplicaron simultáneamente una concentración 1 mM o superior de L-cisteína, la decoloración se inhibió completamente como se muestra en la Figura 5.

La respuesta de enrojecimiento del disco de hoja de lechuga se caracterizó más aplicando un choque térmico antes de inducir la respuesta a la herida. Las hojas desprendidas fueron incubadas durante 90 segundos a 21, 40, 50 y 60 °C. Después de este tratamiento se tomaron discos de hoja y se analizaron en relación con el enrojecimiento. La respuesta de enrojecimiento se inhibió completamente cuando se lleva a cabo el choque térmico a una temperatura de 50 °C o superior. Este resultado se muestra en la Figura 6.

Como se sabe que la L-cisteína reacciona con o-quinonas, que son productos de PPO, convirtiéndolas de nuevo en difenoles incoloros, se determinaron los efectos de la L-cisteína sobre el colorante rosa que procede de discos de hoja de lechuga. En paralelo se determinó el efecto de la L-cisteína sobre la formación de melanina al tener lugar la incubación con L-DOPA.

Se tomaron discos de hoja y se incubaron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. Después de completarse la respuesta a la herida, se añadió una serie de concentraciones de L-cisteína al disco de hoja y se registró el cambio de color. El resultado se muestra en la Figura 7. El experimento demostró claramente que la L-cisteína estaba convirtiendo el colorante rosa de nuevo en un compuesto incoloro mientras que la melanina negra formada en el ensayo de L-DOPA no fue afectada por la L-cisteína. Esto demostró que el colorante rosa es muy probable una o-quinona que se forma por el sistema de oxidación del polifenol de la lechuga.

Para demostrar que la respuesta *in vitro* observada refleja una respuesta que es fisiológicamente relevante la decoloración basada en L-cisteína se aplicó a material vegetal cultivado en campo. Esto se llevó a cabo recolectando una hoja de una planta de lechuga cultivada en el campo que mostraba síntomas severos de enrojecimiento lo largo de las venas. Esto se observa típicamente cuando las plantas han sido sometidas a estrés, por ejemplo por las condiciones de anegamiento severo. La hoja se utilizó para preparar discos de hoja que se incubaron inmediatamente mediante L-cisteína 1 mM. Después de aproximadamente 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la decoloración rosa desapareció tal como se muestra en la Figura 8.

En su conjunto, estos datos experimentales indican que los discos de hoja de lechuga pueden ser inducidos por herida para que produzcan decoloración rosa que es dependiente de PAL y PPO. Este fenotipo permite un procedimiento de cribado efectivo y eficaz para los mutantes de lechuga que tienen una respuesta modificada de decoloración inducida por herida canalizados a través de PAL, de PPO o de ambos.

EJEMPLO 3

Cribado de mutantes con un reducida decoloración inducida por herida.

Con el fin de identificar mutantes de lechuga con bajo potencial de pardeamiento o enrojecimiento enzimático inducido por herida, se aplicó el ensayo de disco de hoja que se describe en el Ejemplo 2 a plantas de una población mutante de lechugas.

Se cultivaron 12.000 plantas en un invernadero (Localización: De Lier, Holanda, siembra el 28 de marzo; plantado 18 de abril; cultivo en las condiciones habituales de los cultivadores de lechuga) y de cada planta individual se tomó un disco de hoja (muestreo desde el 15 de mayo en adelante) y se incubó como grupos de 25 muestras (como promedio) entre papeles de filtro humedecidos a 5 °C durante 7 días. Se dio una puntuación visual a cada disco de hoja dependiendo de la intensidad de la decoloración rosa. Basándose en esta evaluación, las plantas se seleccionaron según que los discos de hojas mostrasen o no un grado relativamente bajo de decoloración de superficie por herida. La planta con trazas de decoloración apenas visibles fue numerada 06D.210202.

De las 12000 plantas, se seleccionó finalmente 1 planta que mostró solamente trazas de decoloración que apenas eran visibles y 11 que mostraron un nivel de decoloración relativamente bajo. 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 para la mayor parte de los casos individuales se confirmó el resultado original. Sólo los individuos confirmados fueron seleccionados para posteriores análisis y producción de semillas.

EJEMPLO 4

Detección de mutantes con una decoloración inducida por herida reducida.

Con el fin de identificar mutantes de lechuga con bajo potencial de pardeamiento enzimático inducido por herida se aplicó el ensayo de disco de hoja que se describe en el Ejemplo 2 a plantas de una población mutante de lechugas. Se cultivaron 8500 plantas en un invernadero hasta una edad de 3 semanas (6-8 etapa de foliación) 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 dio una puntuación visual a cada disco de hoja dependiendo de la intensidad de la decoloración rosa. Basándose en esta evaluación, las plantas se seleccionaron según que los discos de hojas mostrasen o no un grado relativamente bajo de decoloración de superficie por herida. De las 8.500 plantas se seleccionaron 8 plantas que no mostraban decoloración visible y 10 mostraban una decoloración relativamente baja. El ensayo de decoloración se repitió para los 18 individuos que fueron seleccionados inicialmente y para la mayoría de los casos individuales se confirmó el resultado original. Doce individuos se muestran en la Figura 10. Sólo los individuos confirmados fueron seleccionados para su posterior análisis y producción de semillas. Una planta mutante sin efectos pleiotrópicos secundarios (por ejemplo, el blanqueo, enanismo) recibió el número 05D.202539. La semilla producida por autofecundación de esta planta se numeró 05D.810596. La semilla producida por la autofecundación de tres plantas crecidas a partir de semillas de 05D.810596 fue numerada 07G.9979 y depositada en el NCIMB. El número de NCIMB es 41441 (depositado el 10 de octubre de 2006).

EJEMPLO 5

Análisis fenotípico de los mutantes seleccionados que muestran decoloración inducida por herida reducida.

De los 12 mutantes seleccionados del cribado presentado en el Ejemplo 3, seis de ellos mostraron un fuerte fenotipo de crecimiento reducido y de blanqueo. Otros mutantes se desarrollaron normalmente, esto es, según el tipo de la población de partida del experimento de mutagénesis.

Los mutantes enanos y blanqueados son probablemente perturbados en la función del cloroplasto. Como la PPO reside en estos orgánulos celulares, esto puede explicar la respuesta relativamente baja en los ensayos de disco de hoja. Como tales mutaciones pleiotrópicas son indeseables, se consideró que estos mutantes son menos relevantes.

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

EJEMPLO 6

Confirmación de la casi ausencia de fenotipo de decoloración en la descendencia.

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 el presente texto, se produjeron semillas por autofertilización. La semilla producida por autofertilización de la planta 06D.210202 fue numerada 06D.819784. Las semillas se germinaron en tierra y las plantas se ensayaron en relación con la decoloración utilizando el ensayo de pardeamiento de discos de hoja.

Este experimento indicó claramente que el fenotipo alterado tenía una base genética ya que todas las plantas de la progenie mostraron un fenotipo similar, esto es, una fuerte reducción de la decoloración de enrojecimiento, igual que el mutante que se usó para producir las semillas. Este resultado se ilustra en la Figura 11.

- 5 La semilla producida por la autofecundación de tres plantas cultivadas a partir de semillas de 06D.819784 fue numerada 06D.863B2 y depositada en la colección NCIMB. El número de NCIMB es 41454 (depositado el 3 de enero de 2007).

EJEMPLO 7

Desarrollo de un diagnóstico de cribado fenotípico para la decoloración de la lechuga inducida por herida basado en la formación de pigmento marrón.

- 10 Se cultivaron plantas de lechuga hasta la madurez y se tomaron partes de las hojas exteriores mediante el corte de discos del tejido de los nervios. Los discos se incubaron sobre papel de filtro humedecido a 16 °C. Después de aproximadamente 72 horas, la superficie herida se había puesto marrón. En presencia de L-cisteína 10 mM la respuesta de pardeamiento se inhibió indicando que la decoloración observada está mediada por PPO. Un resultado representativo de tal experimento se muestra en la Figura 12.
- 15 Como la respuesta que se muestra en la Figura 12 es una respuesta de pardeamiento mediada por PPO, puede considerarse que el procedimiento de cribado como se describe en este ejemplo es efectivo e imparcial con el fin de cribar en relación con los mutantes que muestran decoloración parda reducida que ocurre durante el procesamiento de la lechuga.

EJEMPLO 8

- 20 *Desarrollo de un diagnóstico de cribado fenotípico para la decoloración de la lechuga inducida por herida basado en la conversión de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) en un pigmento negro llamado melanina.*

- Además de los ensayos que se dirigen a la decoloración inducida por herida en un sentido amplio, el método de acuerdo con esta invención también permite realizar un cribado de una manera más específica en relación con los mutantes que tienen una actividad de PPO reducida. Un ensayo fenotípico que es indicativo de la actividad de PPO
- 25 fue desarrollado mediante el uso de discos de hojas que se incubaron en presencia de L-DOPA 1,5 mM. Dado que se puso de evidencia una decoloración negra, se puede llegar a la conclusión de que la L-DOPA puede convertirse fácilmente por el sistema de oxidación de polifenol en la superficie de la herida de las hojas de lechuga en un pigmento negro llamado melanina. La L-DOPA se convierte por la PPO en la L-DOPA-quinona reactiva que se convierte no enzimáticamente a través de dopacromo e indol quinona en la melanina negra.
- 30 Además, se demostró que la reacción puede ser inhibida añadiendo L-cisteína 1 mM durante la reacción (Figura 5). Por consiguiente, este ensayo hace posible la identificación de mutantes que están modificados en la capacidad de montar una actividad de PPO en una superficie herida de una hoja. La respuesta de los discos de hoja de lechuga a la presencia de L-DOPA se puede observar tanto en solución como entre papeles de filtro humedecidos como se indica en la Figura 13.

35 EJEMPLO 9

Evaluación de la descendencia de un mutante que muestra una ausencia casi total de decoloración en relación con la respuesta de pardeamiento reducida usando el ensayo de pardeamiento en discos de nervadura.

- Para demostrar que la reducción de la decoloración de los mutantes de lechuga como la planta número 06D.210202 de los Ejemplos 3, 5 y 6, que se reduce significativamente en la decoloración rosa de superficies heridas de discos de hoja, también es eficazmente reducida en la respuesta de pardeamiento inducida por herida, se cultivaron varias plantas de la progenie hasta la madurez.
- 40

- En esta etapa de desarrollo, se toman 3 discos de la nervadura central de las hojas externas de varias plantas de la progenie. Estos discos de nervadura se incuban de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7. Se muestra que las plantas de la progenie del mutante que anteriormente mostraron ser fuertemente reducidas en la decoloración rosa inducida por herida también están fuertemente reducidas en el pardeamiento de la nervadura central inducido por herida. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 14.
- 45

EJEMPLO 10

Evaluación de la descendencia de un mutante que muestra la casi ausencia de decoloración en relación con la respuesta reducida de pardeamiento usando cabezas de lechuga recién cortadas envasadas en bolsas de plástico.

- 5 Cabezas maduras de las plantas de lechuga cultivadas a partir de semillas número 06D.819784 del Ejemplo 6, que tiene una significativa decoloración rosa de superficies heridas de discos de hoja, se cortan en trozos utilizando un cuchillo y se envasan en una bolsa de plástico que contiene una atmósfera ambiente. Las plantas testigo que muestran una respuesta de decoloración rosa de disco de hoja normal fueron tratadas de idéntica manera. Las bolsas se almacenaron a 4 °C durante 6 días después de los cuales se evaluó el material de la hoja en relación con su respuesta de pardeamiento.
- 10 Se muestra mediante este experimento que las plantas de la progenie del mutante que anteriormente mostraron ser fuertemente reducidas en la decoloración rosa inducida por herida también son fuertemente reducidas en el pardeamiento de la nervadura central inducido por herida cuando se procesa y se almacena en bolsas de plástico usando una atmósfera ambiente. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 15.¶

REIVINDICACIONES

- 1^a. Planta de lechuga que tiene una decoloración de superficie inducida por herida reducida o ausente, que se puede obtener cruzando una planta con el número de entrada NCIMB 41454 o 41441 con otra planta de la misma especie, y ensayando las plantas que resultan del cruce sometiendo las plantas o partes de las mismas a un método de cribado, que comprende
- 5 a) crear una superficie herida en las plantas o partes de las plantas se han de someter a cribado y en las plantas o partes de plantas testigo o de control;
- b) incubar las superficies heridas para permitir que tenga lugar una decoloración en ellas o sobre ellas;
- c) observar la decoloración de la superficie herida en las plantas o sobre las plantas o partes de las plantas;
- 10 d) comparar la decoloración de la superficie herida observada en o sobre las plantas o partes de plantas que se van a someter a cribado con la decoloración que se observa sobre o en la planta o parte de una planta testigo para identificar las plantas o partes de las plantas que no muestran decoloración o que muestran una decoloración que es reducida en comparación con la planta o parte de la planta testigo.
- 15 2^a. Planta de lechuga según la reivindicación 1^a, en la que las partes de la planta que se van a someter a cribado se seleccionan entre las hojas, cabezas, brotes, raíces, tubérculos, tallos, flores, semillas o trozos y células de las mismas.
- 3^a. Planta de lechuga según la reivindicación 1^a o 2^a, en la que las partes de la planta que se van a someter a cribado son discos de hoja.
- 20 4^a. Planta de lechuga según la reivindicación 1^a o 2^a, en la que las partes de la planta que se van a someter a cribado son discos de tejido de la nervadura central.
- 5^a. Planta de lechuga según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 4^a, en la que la incubación tiene lugar en un entorno acuoso.
- 6^a. Planta de lechuga según la reivindicación 5^a, en la que el entorno acuoso comprende papel de filtro humedecido.
- 25 7^a. Planta de lechuga según la reivindicación 5^a, en la que el entorno acuoso comprende agua o una solución.
- 8^a. Planta de lechuga según la reivindicación 6^a o 7^a, en la que el entorno acuoso contiene un compuesto elegido entre L-3,4-dihidroxifenilalanina, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, L-tirosina y catecol.
- 9^a. Planta de lechuga según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 8^a, en la que la planta testigo es una planta de la cual un disco de hoja, cuando se incuba entre dos láminas de papel de filtro humedecido durante 7 días a 5 °C, muestra decoloración rosa alrededor de los bordes.
- 30 10^a. Planta de lechuga según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 9^a, en la que planta muestra una reducida decoloración de la superficie inducida por herida y no presenta efectos pleiotrópicos negativos.
- 11^a. Progenie de una planta progenitora según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 10^a, que muestra la ausencia o la reducción de decoloración de la superficie inducida por herida como se encuentra en la planta progenitora.
- 35 12^a. Parte de una planta según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 11^a, en la que la parte de la planta muestra una reducida decoloración de la superficie inducida por herida o se puede cultivar en una planta que muestra una reducida decoloración de la superficie inducida por herida.
- 13^a. Parte de una planta según la reivindicación 12^a, la cual parte se elige entre hojas, cabezas, brotes, raíces, tubérculos, tallos, flores, frutos, semillas o trozos de los mismos y células.
- 40 14^a. Planta regenerada a partir de una parte de planta según la reivindicación 13^a que muestra la ausencia o la reducción de la decoloración de la superficie inducida por herida como se encuentra en la progenitora.
- 15^a. Semilla de una planta según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 11^a, en la que las plantas que pueden ser cultivadas a partir de la semilla muestran una reducida decoloración de la superficie inducida por herida.

16^a. Progenie de una semilla según la reivindicación 15^a que muestra la ausencia o la reducción de la decoloración de la superficie inducida por herida como se encuentra en la progenitora.

17^a. Producto vegetal, que comprende una planta de lechuga según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 11^a o parte de la misma.

5 18^a. Producto vegetal según la reivindicación 17^a, en el que el producto es lechuga procesada que no muestra o muestra una limitada decoloración de la superficie inducida por herida.

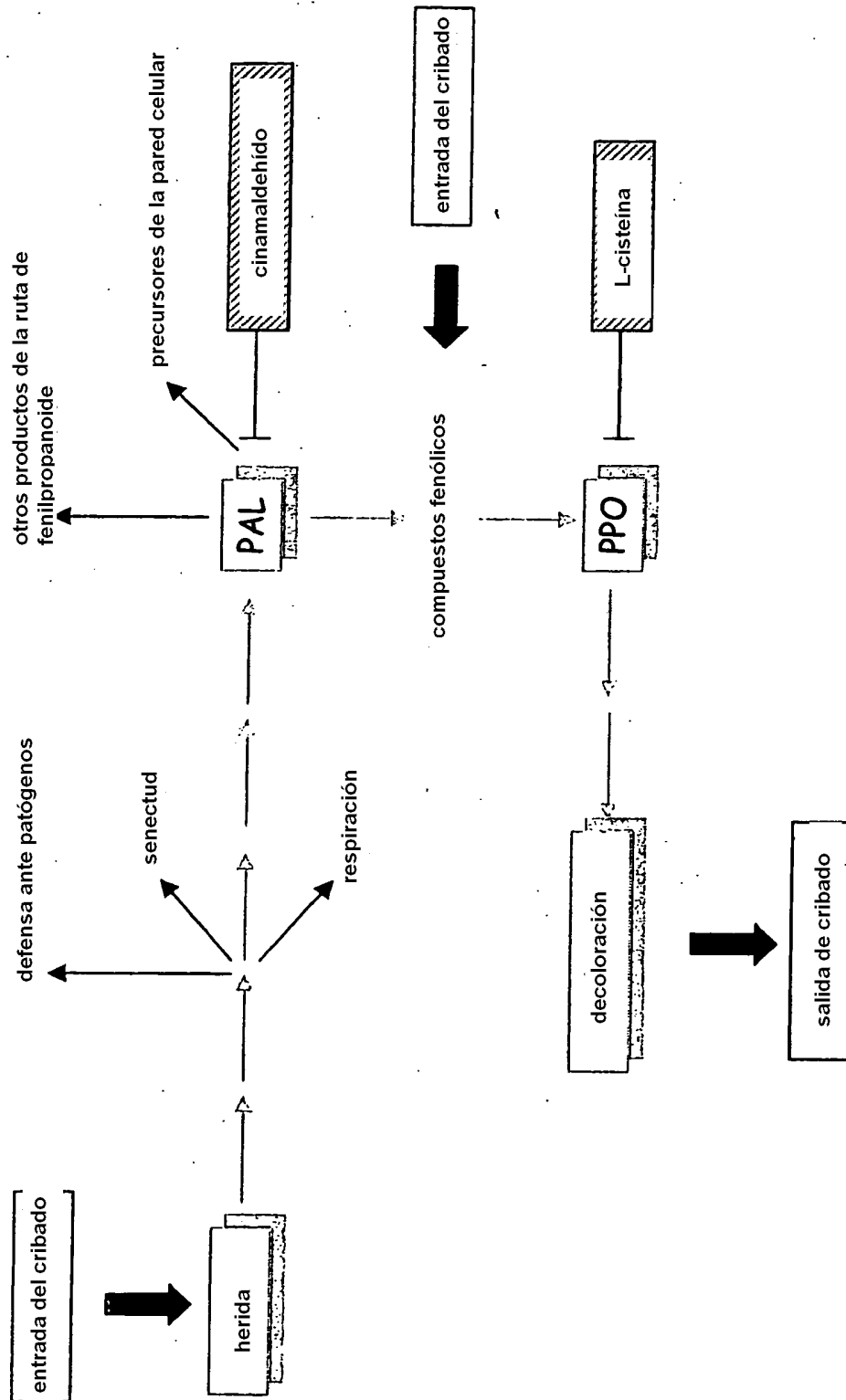
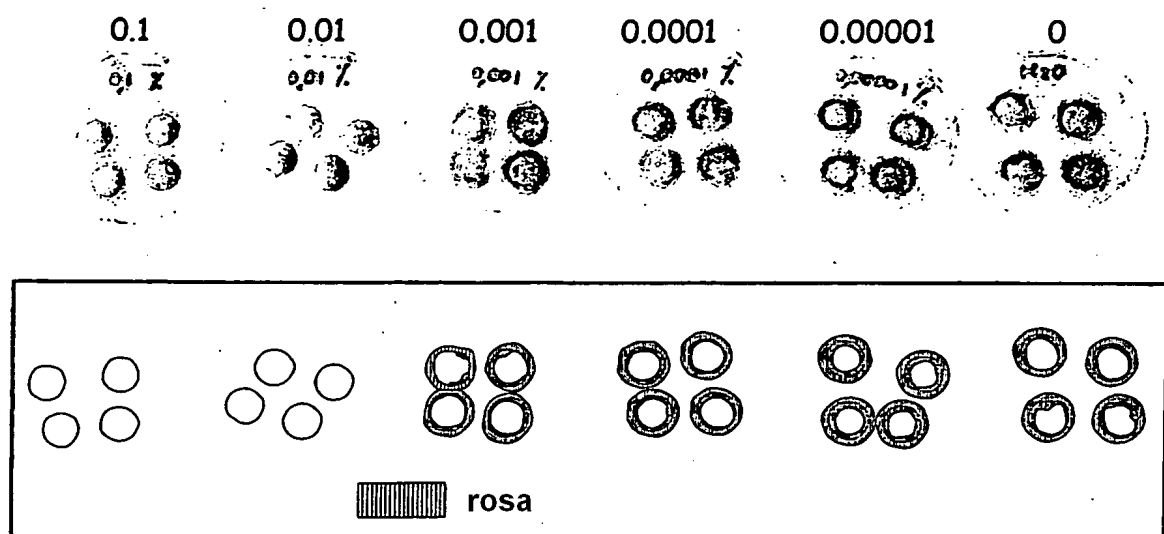
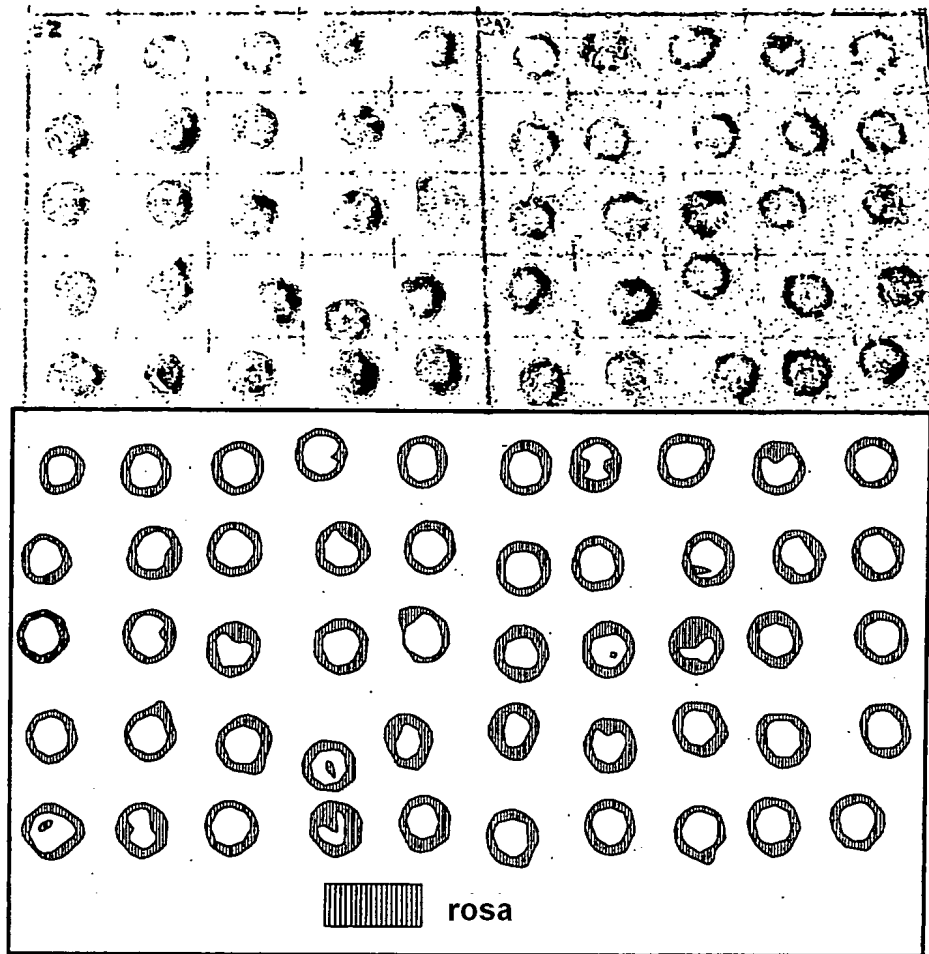


FIG. 1



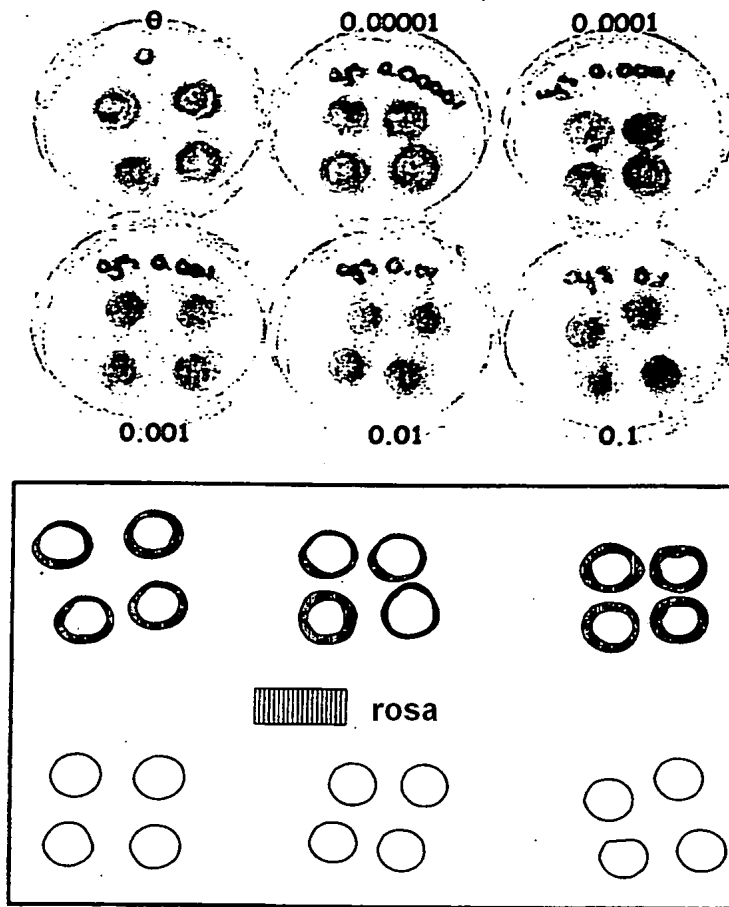


FIG. 4

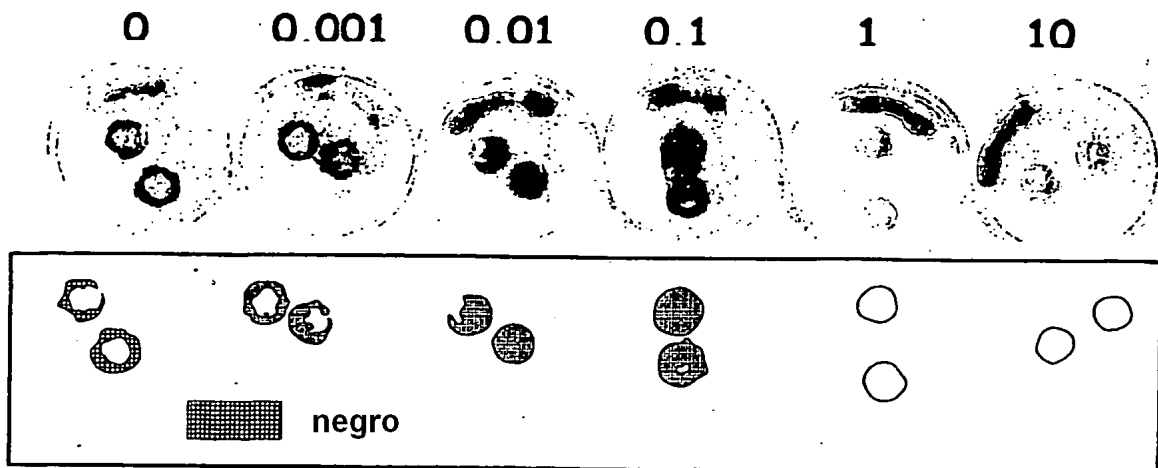


FIG. 5

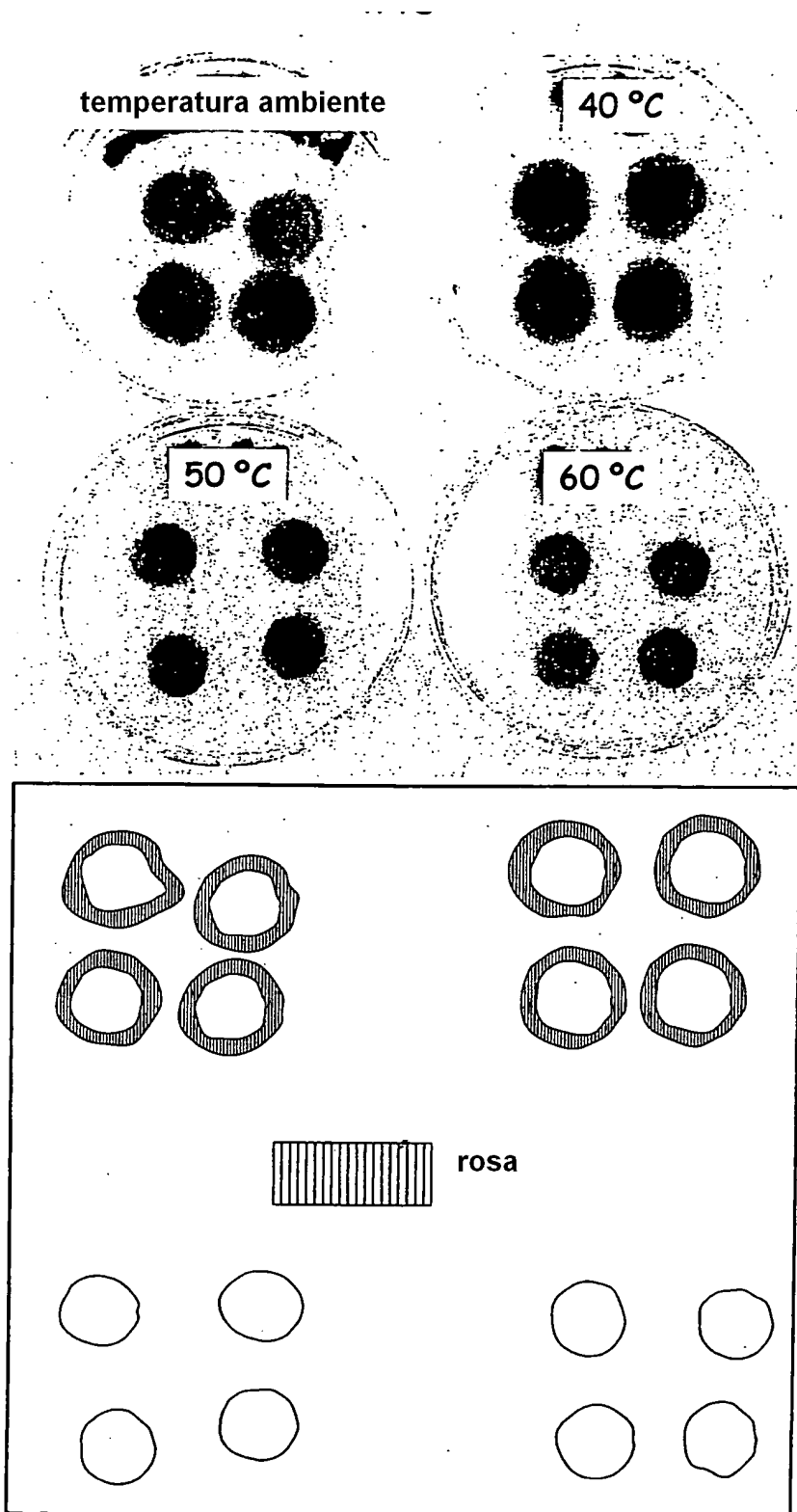


FIG. 6

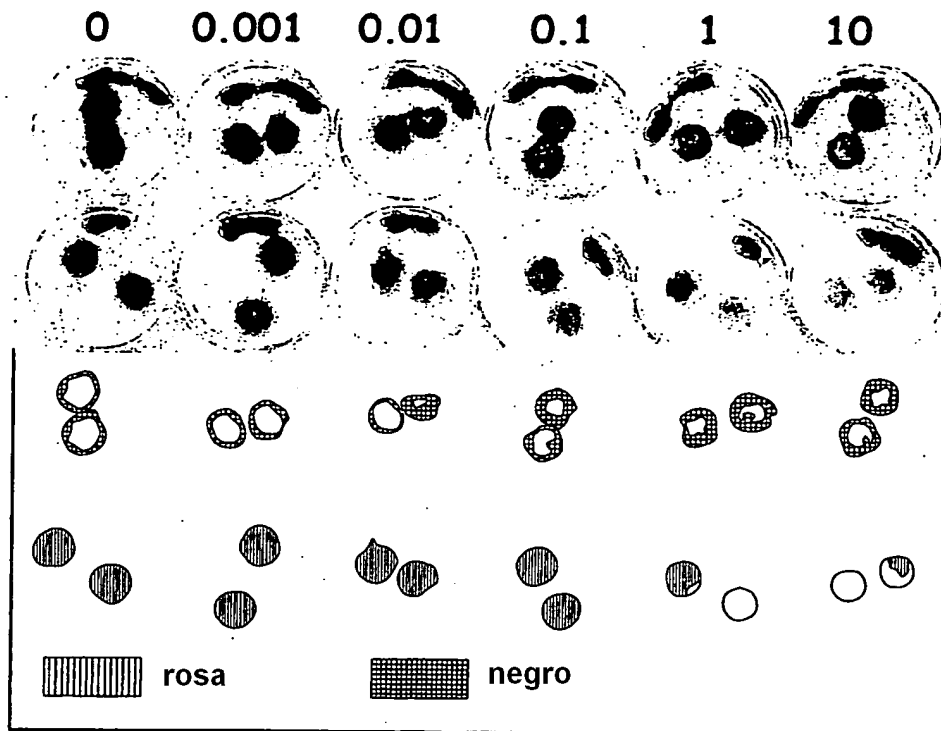


FIG. 7

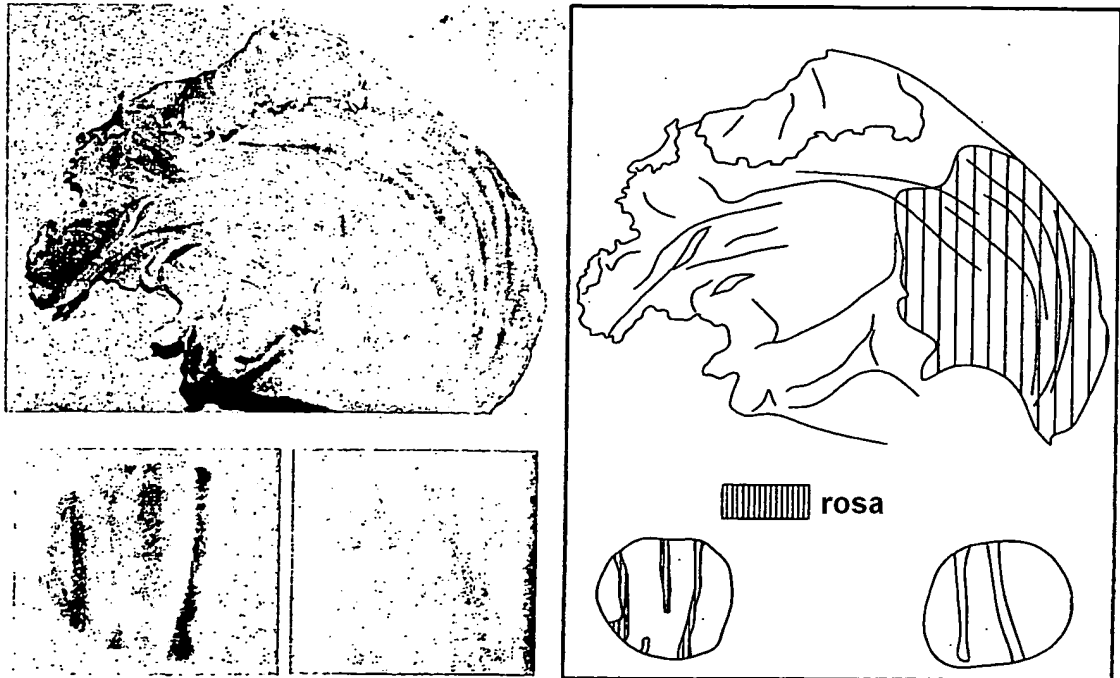


FIG. 8

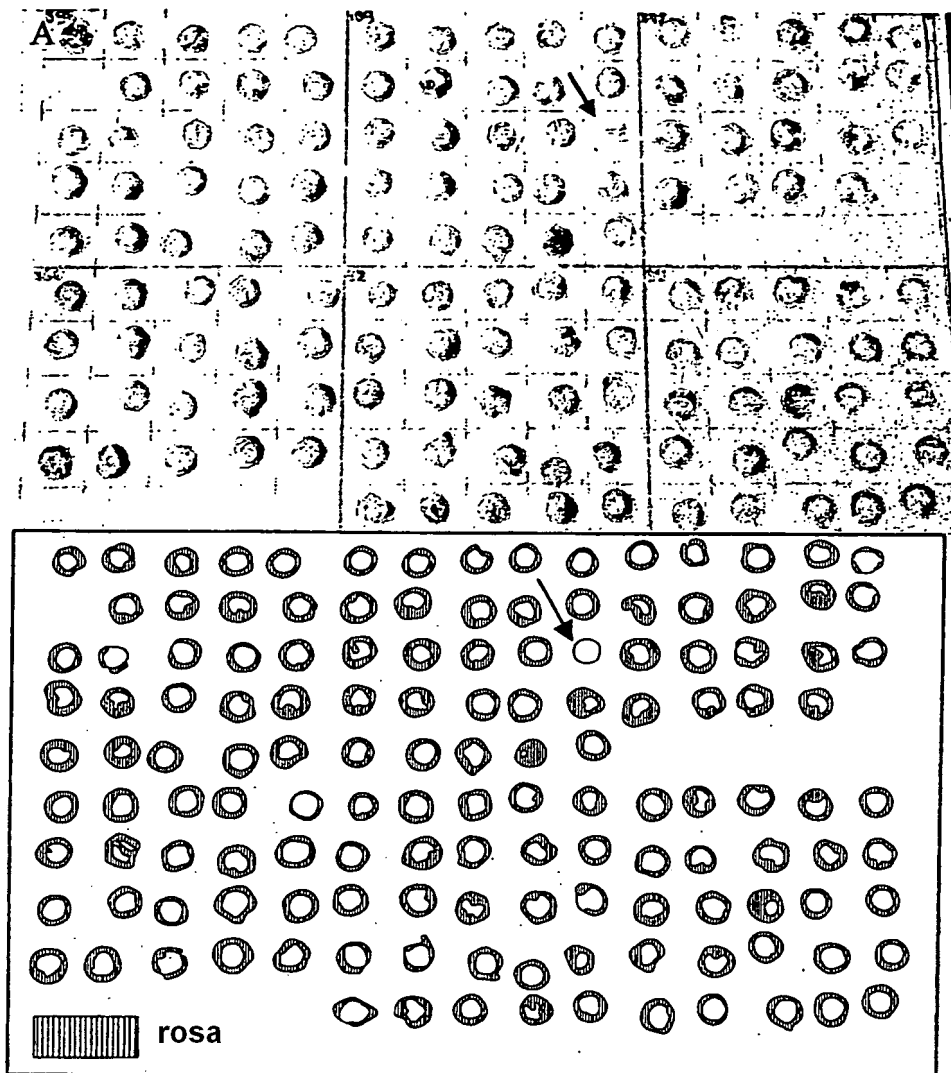


FIG. 9A

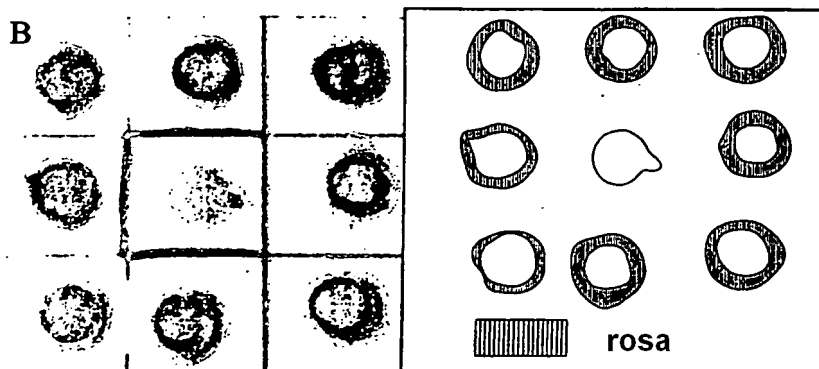


FIG. 9B

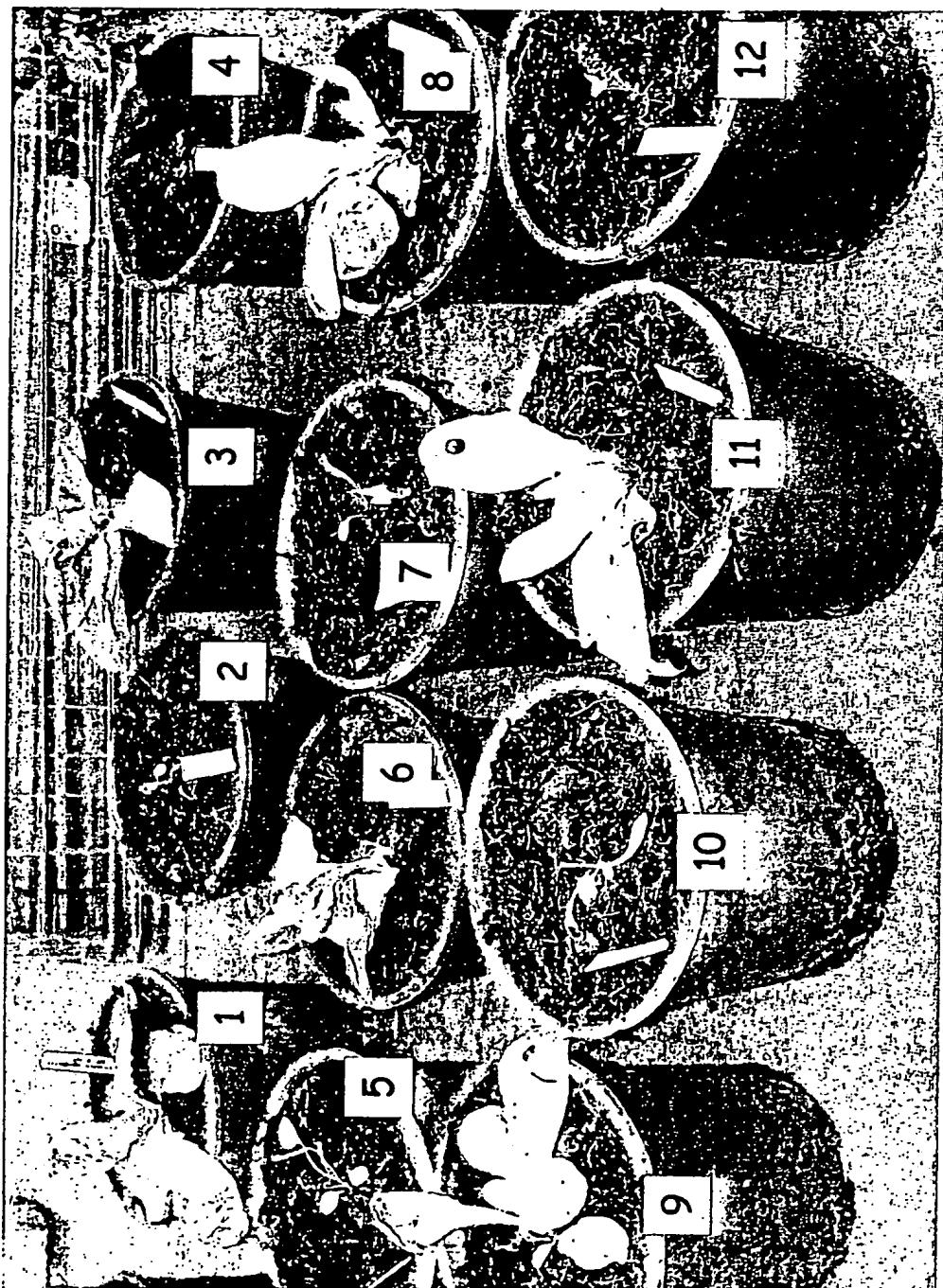


FIG. 10

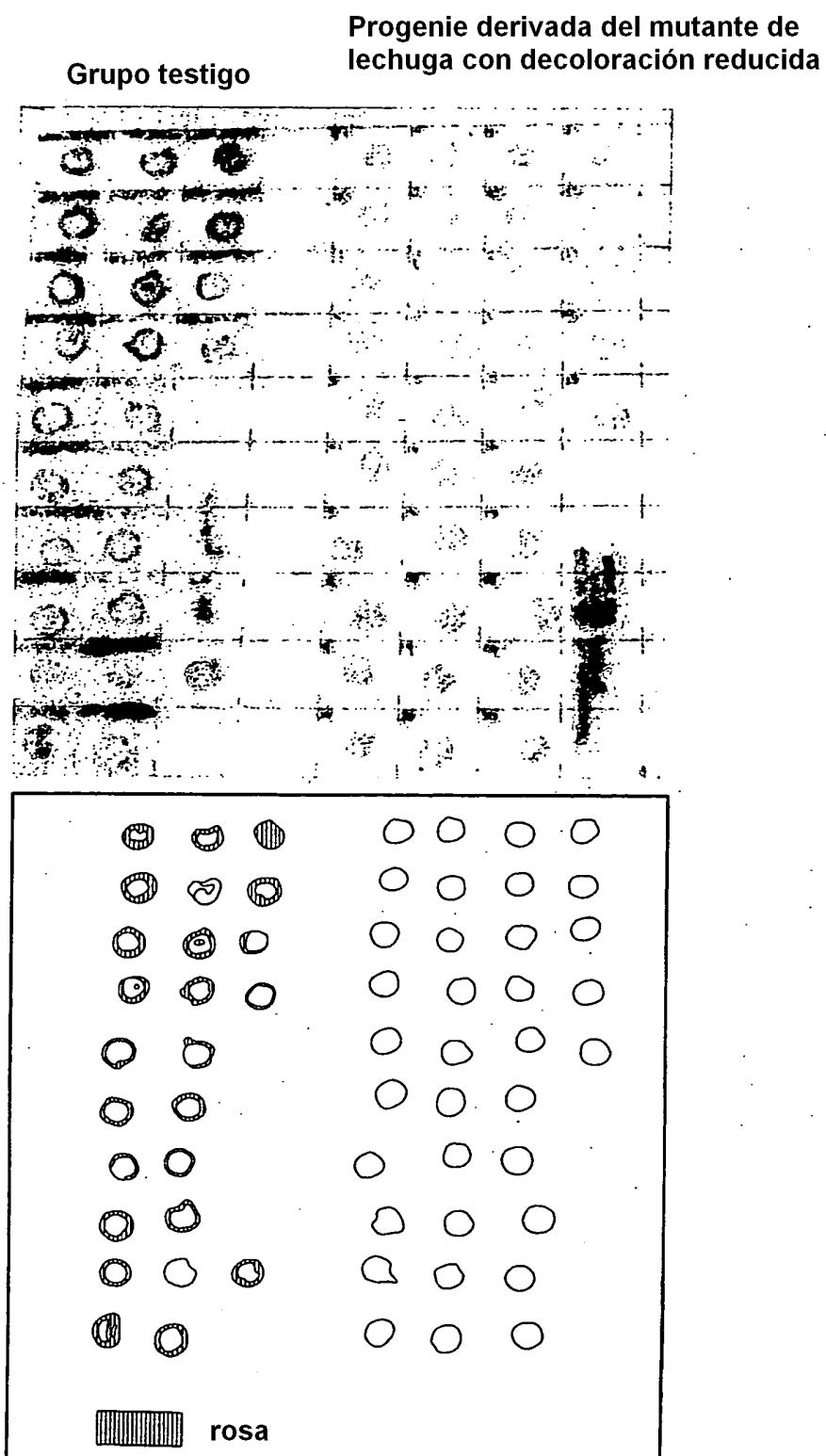


FIG. 11

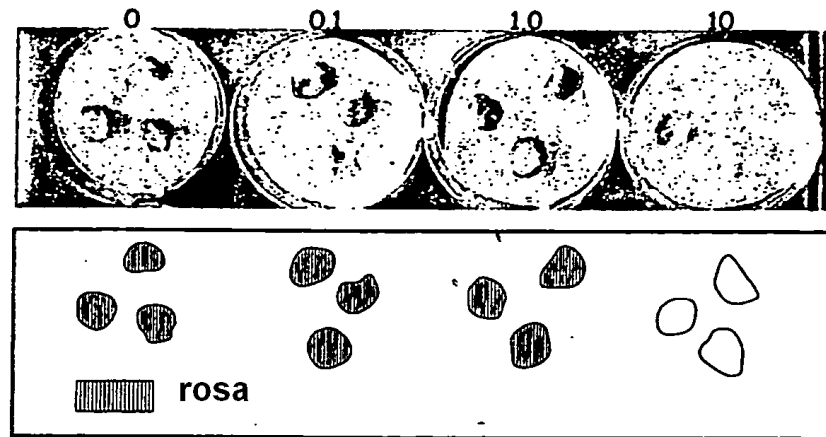


FIG. 12

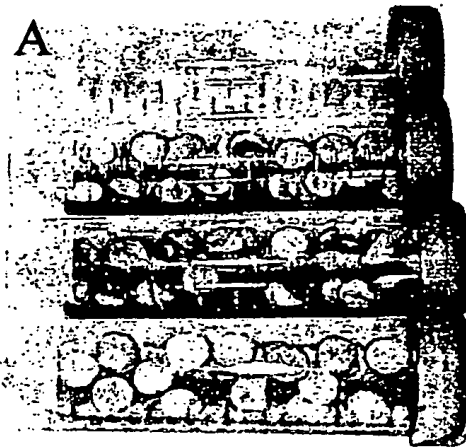


FIG. 13A

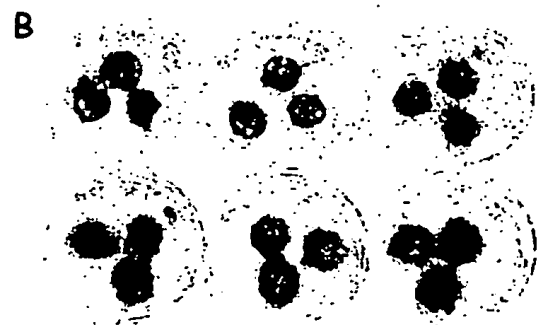
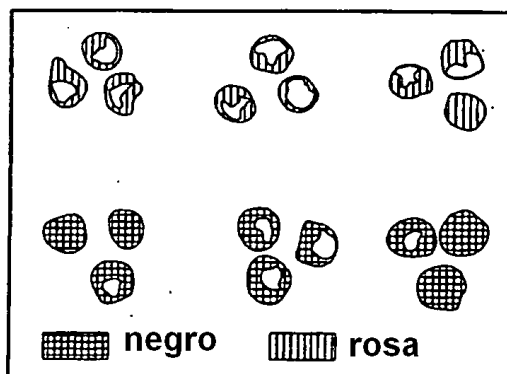
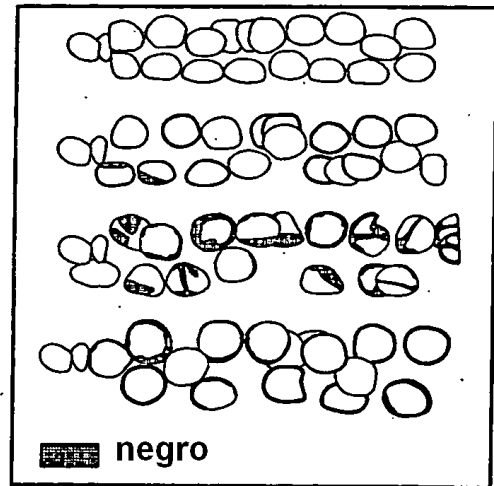


FIG. 13B

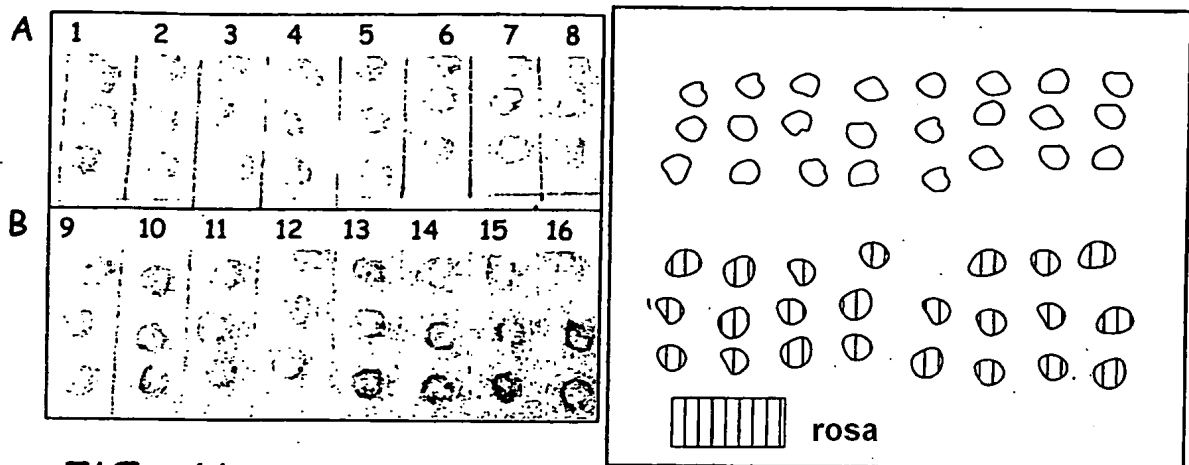


FIG. 14

planta
testigo

mutante de decoloración
reducida

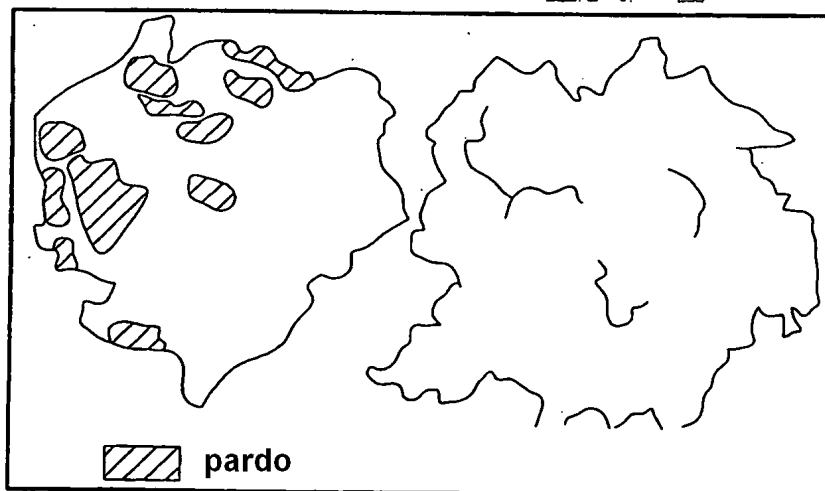


FIG. 15