República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0706433-0 B1

(22) Data do Depósito: 08/01/2007

(45) Data de Concessão: 14/02/2018

(54) Título: MÉTODO PARA TRIAR UMA POPULAÇÃO DE PLANTAS OU PARTES DE PLANTAS QUANTO À PRESENÇA DE INDIVÍDUOS APRESENTANDO UMA DESCOLORAÇÃO REDUZIDA EM COMPARAÇÃO A UMA PLANTA DE CONTROLE OU PARTE DE PLANTA

(51) Int.Cl.: A01H 1/04; A01H 5/12

(30) Prioridade Unionista: 06/01/2006 EP 06075039.5, 17/03/2006 EP 06075645.9

(73) Titular(es): RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.

(72) Inventor(es): CORNELIS MARIA PETRUS VAN DUN

"MÉTODO PARA TRIAR UMA POPULAÇÃO DE PLANTAS OU PARTES DE PLANTAS QUANTO À PRESENÇA DE INDIVÍDUOS APRESENTANDO UMA DESCOLORAÇÃO REDUZIDA EM COMPARAÇÃO A UMA PLANTA DE CONTROLE OU PARTE DE PLANTA"

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a um método para triar uma população de plantas ou de partes de planta quanto à presença de indivíduos apresentando descoloração superficial reduzida induzida por ferimento em comparação a uma planta ou parte de planta de controle.

Fundamento da invenção

Devido à demanda crescente, o processamento de produto fresco, tal como alface, chicória, endívia, e outras hortaliças, expandiu-se significativamente nos anos recentes. A colheita e o processamento de hortaliças com folhas envolvem o corte extensivo das folhas, o que induz uma forte resposta às lesões. Esta resposta ao ferimento leva a uma deterioração rápida do produto processado. Esta deterioração é manifestada pela descoloração devido ao acastanhamento ou rosado enzimático na, e em torno da superfície de ferimento, respiração e dessecação devido à transpiração. Especialmente o acastanhamento ou rosado enzimático é considerado de importância significativa, determinando direta ou indiretamente a qualidade global de hortaliças com folhas recém-colhidas, embaladas, como a alface e a chicória.

Além disto, como uma conseqüência da deterioração, micro-organismos podem aumentar significativamente em número, o que pode comprometer a segurança alimentar. A natureza altamente perecível da alface processada leva a uma forte percepção pelo consumidor da falta de cor, cheiro e textura, o que está atrasando um crescimento mais rápido do que o atual do, assim chamado, mercado de conveniência.

Outras vegetais, como batatas, cogumelos, aipo, alcachofra e berinjela, bem como frutas e flores podem estar sujeitos à descoloração indesejável. Por exemplo, frutas como banana, maçã, pêra, abacate, manga, pêssego e damasco, etc. tornam-se rapidamente acastanhados quando cortados ou descascados. Medidas têm que ser tomadas ao se oferecer estas frutas na forma processada, tais como cortadas, cortadas em cubos, descascadas ou em saladas da fruta.

Caules cortados de flores, por exemplo, da gérbera ou crisântemos, podem igualmente tender à descoloração o que é indesejável sob um ponto de vista comercial porque as descolorações são consideradas não atrativas pelo consumidor reduzindo assim a comerciabilidade do produto.

A fim de inibir o processo de deterioração em hortaliças tais como a alface, muitos tratamentos químicos ou físicos pós-colheita foram desenvolvidos e podem ser aplicados para retardar a deterioração da alface processada.

Entre estes estão a embalagem de hortaliças com folhas, recém-colhidas, sob uma atmosfera modificada, a aplicação de tegumentos comestíveis, tratamento de choque termal e adição de produtos químicos, que inibem o acastanhamento enzimático.

Quando alface recém-colhida é embalada sob uma atmosfera de oxigênio reduzido a baixas temperaturas, o acastanhamento enzimático pode ser substancialmente reduzido. Porém, este ambiente modificado, com pouco oxigênio, leva à respiração anaeróbica, que cria um produto sem gosto e sem cheiro que é percebido como muito desinteressante.

Tegumentos comestíveis são camadas finas de materiais, que atuam como barreira de isolação física e que protegem eficazmente o produto de diferentes formas de deterioração tais como evaporação e acastanhamento. Estes tegumentos podem ser feitos de resinas, de polissacarídeos ou de proteína.

Além disto, demonstrou-se que o acastanhamento da alface recém-colhida pode ser impedido aplicando-se um breve choque termal de 90 segundos a 45°C, imediatamente depois do processamento. Possivelmente, o choque termal desvia a biosíntese da proteína das enzimas envolvidas na descoloração para as proteínas do choque termal reduzindo deste modo a capacidade de acastanhamento enzimático. Alternativamente, o efeito do tratamento de choque termal no acastanhamento pode ser explicado pela termo-sensibilidade das enzimas envolvidas no caminho da descoloração.

Produtos químicos, que podem ser aplicados podem, por exemplo, ser agentes redutores como a vitamina C, agentes de quelação como o EDTA, agentes complexos como a ciclodextrina e inibidores enzimáticos como a L-cisteína. A aplicação de produtos químicos no alimento fresco envolve obviamente itens da segurança alimentar e exigem aprovação reguladora. As combinações de tecnologias pós-colheita descritas acima podem ser lembradas e, ao final das contas, o procedimento aplicado é uma permuta entre a eficácia tecnológica, custo e segurança alimentar.

Independentemente da tecnologia aplicada, a melhoria da qualidade pós-colheita de hortaliças processadas, frutas e flores virá há um custo e conseqüentemente na técnica existe uma necessidade clara de se fornecer alternativas, que eliminem ou reduzam a necessidade de aplicar tecnologias físicas ou químicas pós-colheita

Sumário da invenção

É objetivo da presente invenção prover um método de triagem para selecionar plantas que apresentem uma resposta reduzida de descoloração induzida por ferimento, para prover plantas e progênie delas derivadas que sejam resistentes às lesões do processamento pós-colheita, tais como, o acastanhamento ou rosado enzimático. Descoloração por ferimento pode igualmente ser visível em partes de plantas, tais como caules, sementes, frutas, folhas, flores, tubérculos, brotos, etc. É, assim, um objetivo adicional

da invenção prover um método de triagem para selecionar plantas, que apresentam uma resposta reduzida à descoloração induzida por ferimento em suas partes de planta.

A invenção provê, deste modo, um método para triar uma população de plantas ou de partes de planta quanto à presença de indivíduos que apresentam uma descoloração reduzida em comparação a uma planta de controle, o método compreendendo:

a) prover uma população de plantas ou partes de plantas da população;

b) opcionalmente, criar uma superfície de ferimento sobre as plantas ou partes de planta;

c) incubar a planta ou partes de plantas ou superfícies de ferimento criadas sobre as mesmas para permitir que ocorra descoloração nas, ou, sobre as mesmas;

d) observar a descoloração na, ou sobre as plantas ou partes de plantas;

e) comparar a descoloração observada com aquela observada na planta ou parte de planta de controle para identificar plantas ou partes de plantas que não apresentam descoloração ou descoloração reduzida em comparação com a planta ou parte de planta de controle.

O método da presente invenção tem dois modos de realização principais. No primeiro modo de realização a descoloração é o resultado da conversão de um substrato endógeno. Tal descoloração surgirá espontaneamente com a incubação da planta ou de parte de planta em um determinado ambiente por uma quantidade determinada de tempo. A descoloração é, neste caso, auto-induzida. A invenção refere-se particularmente às reações de acastanhamento e rosado enzimático que ocorrem naturalmente. O método de triagem da invenção pretende identificar plantas que não apresentam esta reação ou apresentam uma reação reduzida

em comparação a um controle.

No segundo modo de realização a descoloração é causada pela conversão de um substrato exogenamente adicionado que pode ser convertido em um substrato colorido que se torne visível quando ocorre a reação na planta. Esta reação de cor pode ser, ou não, induzida por ferimento. Ela ocorre igualmente, por exemplo, nos tegumentos de sementes de sementes intatas. O método de triagem da invenção pretende identificar plantas que não apresentam esta reação ou apresentam uma reação reduzida em comparação a um controle.

O último modo de realização refere-se mais em particular a um método para triar uma população de plantas ou de partes de planta quanto à presença de indivíduos que apresentam uma descoloração reduzida em comparação à planta ou parte de planta de controle, o método compreendendo:

a) prover uma população de plantas ou partes de plantas da população;

b) incubar a planta ou partes de plantas com um substrato que pode ser convertido em um pigmento colorido para permitir que ocorra descoloração nas, ou, sobre as mesmas;

c) observar a descoloração na, ou, sobre as plantas ou partes de plantas;

d) comparar a descoloração observada com aquela observada na planta ou parte de planta de controle para identificar plantas ou partes de plantas que não apresentam descoloração ou descoloração reduzida em comparação com a planta ou parte de planta de controle.

O método da invenção pode ser usado para qualquer planta que possa estar sujeita à descoloração, mas é, em particular, útil para produzir, em particular hortaliças ou frutas, ou flores. O método é, entre outras coisas, apropriado para hortaliças com folhas, tais como alface, chicória ou endívia,

para tubérculos, como batata ou batata doce, para raízes, tal como o aipo, para brotos, tais como a chicória-endívia, ou para cogumelos. O método pode, além disto, ser usado para frutas, tais como maçã, banana, abacate, pêssego, pêra, damasco, manga, berinjela e para flores ou caules de flores, tais como caules da gérbera, flores de crisântemo, fundos de alcachofra etc.

O método de triagem da invenção pretende identificar plantas que têm uma pequena superfície de descoloração induzida por ferimento em uma ou mais de suas partes ou tecidos. Para a triagem, é conseqüentemente muito prático usar a parte ou tecido que tem tendência à descoloração. Na alface, esta pode ser a folha ou uma parte dela, como um furo de folha, pode ser apropriadamente usada em fatias de banana da fruta descascada e, fatias de caule de flores, são um veículo de teste muito prático.

Entretanto, descobriu-se que a descoloração pode ser testada igualmente em tecidos que não estão lesionados. Nos Exemplos mostra-se que também tegumentos intatos de semente e pontas de raiz são capazes de induzir uma reação de cor na presença de um substrato exogenamente adicionado que possa ser convertido em um pigmento colorido sem ser lesionado. A redução ou a ausência desta reação de cor pode ser usada na triagem de plantas que têm uma descoloração reduzida.

Em um modo de realização específico o método é em particular útil para triar as plantas que pertencem à família Asteraceae, em particular do gênero Lactuca e mais em particular às espécies Lactuca sativa ou às plantas que pertencem ao gênero Cichorium e em particular às espécies do Cichorium intybus e Cichorium endívia que apresentam uma ausência ou redução de superfície de descoloração induzida por ferimento.

A população de planta que é triada com o método da invenção pode ser qualquer população de planta, mas é preferivelmente uma população de planta variável que tenha muitos membros diferentes para aumentar as possibilidades de se encontrar uma planta que apresente uma descoloração

induzida por ferimento reduzida. Uma população tão variável pode ser criada por meio de um tratamento mutagênico usando-se, por exemplo, produtos químicos e/ou irradiação e é chamada então, aqui, uma população de planta mutante. Populações alternativas são as coleções de germoplasma, que são coleções de plantas apresentando variação natural. Além disto, uma população de plantas transgênicas pode ser usada.

O método da invenção é executado apropriadamente com partes de planta que têm uma superfície de ferimento. Amostras-teste muito úteis são os discos que são perfurados de uma folha, os assim chamados discos de folha. Alternativamente, o tecido da nervura central de hortaliças com folhas venadas pode ser usado. Apropriadamente, os discos são cortados destas nervuras. Nas frutas as superfícies cortadas de meias frutas podem ser avaliadas ou alternativamente fatiadas ou cortadas em cubo. Para flores, fatias do caule são uma amostra-teste muito prática.

A incubação ocorre, apropriadamente, em um ambiente aquoso. O método da invenção pode ser muito bem praticado com discos de folha que sejam incubados sobre, ou, entre papel de filtro umedecido. A resposta de cor é então muito bem visível em torno das bordas do ferimento sobre o papel.

Alternativamente, o ambiente aquoso compreende água ou uma solução. Em um modo de realização específico que será ilustrado mais abaixo a solução contém um substrato, tal como L-3,4-dihidroxifenilalanina. Este composto é convertido para a produção do pigmento preto melanina pela oxidase de enzima de polifenol. Os compostos da alternativa que podem ser usados para a triagem das plantas da alface em relação a isto incluem mas não estão limitados ao ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, L-tirosina e catecol.

A invenção pode, além disto, ser executada com a progênie de uma planta-mãe que apresente ausência ou redução da descoloração da folha

induzida por ferimento para demonstrar que a progênie ainda tem a mesma ausência ou redução da descoloração da folha induzida por ferimento encontrada na planta-mãe.

A invenção pode igualmente ser executada em partes de plantas. Partes de plantas como cabeças ou folhas da alface e de endívia são, geralmente, as partes que têm uma superfície de corte que pode ser sujeita à descoloração. Outras partes são frutas, brotos, raízes, sementes, tubérculos, flores, caules, etc.

Em um modo de realização adicional da invenção, sementes ou sementes germinadas podem ser usadas como o veículo em que o método de triagem é executado na presença de um substrato exogenamente adicionado. No caso de sementes germinadas, as pontas da raiz jovem são envolvidas na reação de cor.

A invenção é, comercialmente, muito interessante por identificar plantas mutantes que podem ser usadas no mercado de hortaliças processadas. Como explicado acima, a descoloração do produto, em particular frutas e verduras frescas, é considerada indesejável, uma vez que o produto descolorido é rejeitado pelo consumidor.

Descrição detalhada da invenção

Quando a alface é colhida e processada por corte, são geradas muitas superfícies de folhas lesionadas o que leva a uma resposta significativa da planta ou de partes de planta, manifestada por uma descoloração acastanhada ou rosada na, ou, junto à superfície de ferimento. O rosado pode ser igualmente observado em locais distantes da superfície de ferimento, na nervura central da folha, assim como, na extremidade. Às vezes, o rosado pode ser igualmente observado em estágios logo antes da colheita, o que é considerado ser devido ao dano abiótico ou sobrematuridade da safra.

Outras plantas, em particular outras hortaliças, frutas e flores podem, igualmente, ter tendência à descoloração. O método da invenção é

assim, igualmente, uma triagem muito conveniente para identificar outras plantas, em particular outras hortaliças, ou frutas ou flores que apresentam resposta reduzida à descoloração induzida por ferimento

As diferentes formas de descoloração são afetadas pela atividade enzimática, que é fortemente realçada como uma conseqüência do ferimento e que gera diversas formas de polifenóis e produtos de reação derivados dos mesmos.

Uma atividade enzimática importante envolvida na reação de acastanhamento é PPO. Atividade de PPO com relação ao acastanhamento enzimático não está restrito à alface, e foi descrita para muitas outras espécies de plantas envolvidas na deterioração pós-colheita como maçã, banana e a batata. De fato, PPO é reconhecida extensamente por ser uma das enzimas mais importantes envolvida na deterioração pós-colheita de muitas frutas e verduras frescas processadas.

Por este motivo a PPO tem sido alvo de muitas tecnologias, visando a redução ou a prevenção destas atividades a fim de aumentar a qualidade pós-colheita de produtos de alimentação. A PPO catalisa uma reação na qual polifenóis que residem no tecido da planta são oxidados, provocando a formação de o-quinonas. Subseqüentemente, as reações enzimáticas e não-enzimáticas levam à formação de pigmentos marrons ou pretos.

Em muitas espécies de plantas, a PPO é codificada por uma pequena família de gene cujos membros individuais podem ter padrões de expressões temporais e espaciais diferentes, indicativos de divergência funcional. Por exemplo, mostrou-se que a alface contém isoformas de PPO diferentes nos tecidos fotossintético e vascular da folha.

O substrato natural da PPO pode diferir entre as diferentes espécies. A tabela 1 lista os substratos da PPO para várias hortaliças e frutas que estão sujeitas à descoloração por ferimento. Estes e outros substratos

podem ser usados em um método de triagem baseado no substrato exógeno, da invenção.

Tabela 1

Fontes	Substratos Fenólicos
Maçã	ácido clorogênico (carne), catecol, catequina (casca), ácido caféico, glicosídeos de flavanol, 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), 3.4 ácido benzóico dihidroxila, p-cresol, 4-metil catecol, leucocianidina, ácido p-cumárico,
Damasco	ácido isoclorogênico, ácido caféico, 4 metil catecol, ácido clorogênico, catequina, epicatequina, pirogalol, catecol, flavonóides, derivados de ácido p-cumárico
Abacate	4-metil catecol, dopamina, pirogalol, catecol, ácido clorogênico, ácido caféico, DOPA
Banana	3,4-dihidroxifeniletilamina (Dopamina), leucodelfinidina, leucocianidina
Berinjela	ácido clorogênico, ácido caféico, ácido cumárico, derivados de ácido cinâmico
Alface	tirosina, ácido caféico, derivados de ácido clorogênico
Manga	dopamina-HCl, catecol de 4 metil catecol, ácido caféico, catecol, catequina, ácido clorogênico, tirosina, DOPA, p-cresol
Cogumelo	tirosina, catecol, DOPA, dopamina, adrenalina, noradrenalina
Pêssego	ácido clorogênico, pirogalol, 4-metil catecol, catecol, ácido caféico, ácido gálico, catequina, dopamina
Pêra	ácido clorogênico, catecol, catequina, ácido caféico, DOPA, 3,4-ácido benzóico dihidroxila, p-cresol
Batata	ácido clorogênico, ácido caféico, catecol, DOPA, p-cresol, p-hidroxifenil, ácido propiônico, ácido pirúvico p-hidroxifenil, m-cresol
Batata doce	ácido clorogênico, ácido caféico, cafeilamida

Em muitas plantas, o nível da enzima PPO não é induzido especificamente pelo ferimento de tecidos da planta e reside, inertemente, no cloroplasto. Com o ferimento, a PPO é ativada, o que é manifestado devido ao fato do substrato fenólico que reside nos vacúolos ser posto em contato com a PPO devido ao rompimento do tecido.

Na alface, a produção de polifenóis, que são o substrato da PPO, é induzida pelo ferimento. Conseqüentemente, o potencial de acastanhamento do tecido da alface parece não estar limitado pela quantidade da PPO no tecido da folha, mas um pouco pela taxa de bio-síntese do polifenol pelo ferimento.

A este respeito, a situação pode diferir entre colheitas. Por

exemplo, na maçã a quantidade de polifenóis é suficiente para gerar uma resposta de acastanhamento das frutas dentro de uma hora após o ferimento enquanto que na alface a reação de acastanhamento pode levar alguns dias devido ao fato de que, na alface, a associação de polifenol exige muito ser sintetizada de novo com o ferimento.

A síntese dos polifenóis ocorre através de um caminho bioquímico bem-caracterizado, chamado o caminho do fenilpropanóide. Primeiramente, a etapa executada deste caminho é catalisação pela enzima de fenilalanina amônia liase (PAL, Hahlbrock, K e Scheel, D (1989) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40, 347-369). A PAL converte a fenilalanina do aminoácido sintetizado através de via shiquímica em ácido cinâmico.

Na alface, o ferimento das folhas leva a uma indução forte da expressão de gene da PAL e da atividade da PAL. A formação de polifenóis é correlacionada com esta atividade enzimática, que sugere que a atividade da PAL induzida pelo ferimento da alface é um fator importante responsável pelo acastanhamento (Campos, R. e outros (2004) Physiologica Plantarum 121, 429-438 e referências da mesma). Entretanto, é atualmente obscuro que outros fatores determinam o resultado final da reação de descoloração induzida por ferimento. Por exemplo, a atividade das peroxidases (POD) foi sugerida como sendo também importante para estabelecer o nível final de descoloração (Fukumoto, L.R. e outros (2002) J. Agric. Food Chem. 540, 4503-4511; Martin-Diana A. e outros (2005) Biosci. Biotechnol. Biochem. 69, 1677-1685).

Uma vez que a atividade da enzima depende da disponibilidade de água oxigenada interna, a contribuição da POD à descoloração pode ser limitada.

É, além disto, evidente que o ferimento é percebido de algum modo pela planta e, por isto, um sinal é gerado através de uma ondulação, que atualmente é mal definida para a alface. Parece óbvio que estas atividades

serão direcionadas primariamente para a cicatrização do ferimento e para a defesa contra micróbios patógenos. Conseqüentemente, é provável que muitos fatores genéticos estejam envolvidos na criação da resposta da descoloração de tecido lesionado da alface e cada um destes são alvos potenciais para modificação genética para reduzir ou eliminar a descoloração induzida por ferimento.

A maioria destes fatores genéticos é atualmente desconhecida e para aqueles conhecidos por seu envolvimento não é claro qual a extensão do papel específico que estes fatores desempenham na reação de descoloração, ou se talvez tenham uma função mais geral em relação à fisiologia do ferimento da planta.

Por exemplo, embora a atividade da PAL induzida por ferimento seja considerada para determinar o nível de acastanhamento da alface, sabe-se que produtos do caminho fenil propanóide estão envolvidos inter alia na biosíntese ou, também, na resposta de defesa. Conseqüentemente reduzindo-se a atividade da PAL induzida por ferimento a fim de reduzir o potencial de acastanhamento pode comprometer outras funções além do acastanhamento induzido por ferimento o que pode ser menos desejável em relação a outros aspectos do cultivo da alface.

Do mesmo modo, a atividade da PPO tem sido inferida como envolvida na resposta de defesa e conseqüentemente a redução do potencial de acastanhamento reduzindo-se níveis da PPO pode aumentar a susceptibilidade aos patógenos (Thipyapong, P. e outros (2004) Planta 220, 105-117). Conseqüentemente, os inventores raciocinaram que uma abordagem mais imparcial poderia ser mais bem sucedida a este respeito. Esta abordagem compreende as seguintes etapas:

1. Geração de uma população mutável de plantas, em particular, uma população mutante. Esta população mutante pode ser gerada pelo tratamento de sementes ou tecidos da planta com agentes mutagênicos,

como o sulfonato etil metano (ems) ou raios-x.

2. Estabelecimento de uma triagem fenotípica eficiente, na qual a triagem é baseada em uma descoloração da planta, em particular, em uma descoloração induzida por resposta ao ferimento da planta, que é canalizada através da PAL e/ou da PPO.

3. Caracterização dos mutantes modificados por sua resposta ao ferimento no que diz respeito ao potencial de descoloração pós-colheita e à ausência de efeitos pleiotrópicos da modificação, que comprometem o cultivo e o processamento da planta de acordo com a prática comum.

A invenção refere-se, assim, a um método de triagem para identificar, selecionar e obter uma planta apresentando uma descoloração induzida por ferimento reduzida e desordens de processamento pós-colheita tais como o acastanhamento ou rosado enzimático. No método de triagem, a descoloração pode ser observada em uma superfície de ferimento mas, igualmente, descobriu-se que os tecidos intatos também apresentam uma reação de cor pela adição de um substrato.

Uma população de planta mutante para uso no método da invenção pode, por exemplo, ser preparada como segue:

a) tratar sementes M0 de uma espécie da planta a ser modificada com um agente mutagênico para obter sementes M1;

b) cultivar plantas das sementes Ml assim obtidas para obter plantas M1;

c) opcionalmente repetir as etapas b) e c) n vezes para obter Ml+ n sementes;

d) germinar as Ml+n sementes assim obtidas e cultivar as plantas destas sementes.

De acordo com a invenção, estas plantas são subseqüentemente analisadas para resposta à descoloração induzida por ferimento. Plantas que não apresentam ou apresentam uma resposta reduzida

à descoloração pelo ferimento são selecionadas. Deste modo, a progênie das plantas selecionadas é cultivada e a resposta da descoloração induzida por ferimento é medida.

Para a criação de variabilidade genética pode ser feito uso da mutagênese. Diversos produtos químicos ou tratamentos físicos são conhecidos dos peritos na técnica e podem ser usados para induzir mutações genéticas em espécies de plantas. Por exemplo, alguém pode tratar sementes em uma solução contendo diferentes concentrações de um mutageno como o ems. Alquilatos de ems, primariamente resíduos G de uma trança de ADN que, durante a duplicação do ADN, provocam o casamento com T em vez de C. Conseqüentemente, os pares-base GC mudam para pares-base AT a uma freqüência que é determinada pela dose efetiva de ems e pela atividade do sistema de reparação de má combinação da planta.

A dose efetiva de ems depende da concentração usada, do tamanho da semente e de outras propriedades físicas, e do momento da incubação das sementes na solução de ems. Sementes que foram tratadas com um agente mutagênico são chamadas, tipicamente, de sementes M1. Como uma conseqüência do tratamento, os tecidos das sementes M1 contêm mutações de pontos aleatórios nos genomas de suas células, e aqueles presentes na subpopulação das células, que formam o tecido da linha germinativa (células germinais), serão transferidos para a geração seguinte, que é chamada M2. Mutações ou combinações que são haplo-insuficientes, provocando, deste modo, esterilidade ou que induzam à mortalidade do embrião, não são transferidas para a geração M2.

Um procedimento similar ao descrito acima para o uso de ems se aplica, igualmente, a outros agentes mutagênicos. Agentes mutagênicos apropriados são bem conhecidos na técnica. Particularmente úteis são os agentes mutagênicos alquilantes, como o sulfato dietil (DES), etileneimina (ei), propano sultona, N-metil-N-nitrosouretano (mnu), N-nitroso-N

metilureia (NMU), N-etil-N-nitrosoureia (enu), azida de sódio.

Alternativamente, as mutações são induzidas por meio de irradiação, que, por exemplo, é selecionada de raios X, nêutrons rápidos, irradiação UV.

Em outro modo de realização da invenção, as mutações são induzidas por meio da engenharia genética, como por meio do uso de oligonucleotídeos quiméricos, recombinação homóloga introdução de genes-alvo modificados que competem com o produto endógeno, regulação decrescente através de interferência de RNA, etc.

A população do M2 de um tratamento de mutagênese pode ser usada nos procedimentos de triagem dirigidos à resposta do ferimento que é canalizada através da PAL e da PPO. É óbvio ao artesão experiente que qualquer população de plantas, que porte variação genética pode ser tomada como material inicial para esta triagem fenotípica, tal como as coleções de germoplasma, que são coleções de plantas apresentando variação natural ou populações de plantas transgênicas.

A produção de sementes Ml e M1+n é efetuada apropriadamente por meio autopolinização.

A fim realizar a triagem fenotípica da invenção, uma superfície de ferimento deve ser gerada uma vez que a reação de descoloração enzimática é induzida pelo ferimento. Este ferimento pode ser conseguido cortando, perfurando, fatiando, por abrasão, espremeção, quebra, descascando, esmagando, pressionando, reduzindo, moendo, por injeção fluida, choque osmótico, removendo, segando, rasgando.

Descobriu-se que o método da invenção no qual substrato adicionado exogenamente é usado pode, igualmente, ser praticado em tecidos e em partes de planta intatos, tais como sementes, nas situações onde a PPO está dentro do alcance do substrato, por exemplo, quando a PPO é segregada ou localizada fora da célula. A enzima que induz a reação de cor está, então,

igualmente disponível sem ferimento prévio.

Após o ferimento ou quando nenhum ferimento é necessário, deve se manifestar uma característica fenotípica que é diagnóstica para o caminho que leva à descoloração do tecido e que pode ser usada muito eficientemente em uma triagem da população mutante.

Descobriu-se, surpreendentemente, que estas características fenotípicas poderiam ser obtidas coletando-se parte da planta e incubando-as sob circunstâncias muito específicas que favoreceriam a ocorrência de formas diferentes de descoloração, em particular descoloração de superfície de ferimento. Subseqüentemente, estas análises puderam ser aplicadas a um grande número de plantas ou partes de planta, tais como as plantas mutantes, de modo a triar aquelas plantas que apresentassem uma redução à resposta da descoloração induzida por ferimento.

Um modo de realização desta invenção está baseado na descoberta surpreendente de que, quando os discos de folhas, tais como as folhas da alface ou folhas da endívia ou da escarola, são coletados e incubados entre papéis de filtro umedecidos a 5°C, após, aproximadamente, 4 dias a formação de uma pigmentação rosada nas bordas dos discos de folha torna-se aparente. O papel de filtro apropriado é o papel tipo 1450 CV de filtro, Ref. no. 10 313 281 de Schleier & Schuell, Microscience GmbH, Dassel, Alemanha. Com incubação adicional, o sinal se intensifica e após aproximadamente uma semana a intensidade máxima foi atingida. A formação da pigmentação rosada ocorre, especificamente, nas superfícies de ferimento.

A descoloração pode ser medida marcando-se sobre uma escala visual a partir de 0, que significa nenhum acastanhamento ou rosado, até 10, que significa acastanhamento ou rosado igual a uma variedade padrão da planta a ser selecionada (por exemplo, L. sativa para a triagem da alface). Nos Exemplos relativos à alface, a variedade "Troubadour" da L. sativa é

usada como um padrão para 10.

Se desejado, fotos podem ser usadas para comparação com resultados de classes intermediárias entre 0 e 10. Além disto, fotos digitais podem ser tiradas do papel de filtro com a pigmentação rosada ou acastanhada, seguido da contagem por posição do disco de folha do número de pixéis com uma cor rosada ou acastanhada intensa. Usando-se uma destas medidas, análises estatísticas simples como o teste-t, bastante conhecido dos peritos na técnica, podem ser executadas para determinar se uma planta ou grupo de plantas é significativamente menos rosado ou acastanhado do que o padrão. O nível de significância aplicado de um teste unilateral é 0,001.

Para mutantes, a comparação estatística pode ser feita entre as contagens rosadas da variedade original, que é o melhor padrão disponível, e as contagens rosadas do mutante individual e/ou sua descendência.

Para encontrar a feição da invenção em plantas existentes, amostras representativas de variedades, linhas de reprodução e/ou acessos a bancos de genes podem ser usados. A comparação estatística pode, então, ser feita entre as contagens rosadas do acesso individual sob investigação e o restante da população. Quando testando estatisticamente indivíduos para significativamente menos rosado, testes de comparação múltiplos podem ser necessários para manter os níveis de significância total apropriados, por exemplo, o teste de comparação múltipla de Dunnett com um padrão (Dunnett CW, J. Amer. Statist. Assoc. 50:1096 - 1121 (1955)).

Além disto, mostrou-se que esta resposta pode ser obtida usando-se muitos tipos diferentes de tecido de folhas de diferentes estágios de desenvolvimento. Por exemplo, na alface, o tecido da nervura central pode, igualmente, ser induzido para dar esta resposta pelo ferimento. Quando aplicada aos diferentes tipos de alfaces, tais como, de cabeça-gigante, crocante, romana, da Batávia ou serrilhada, nenhum acesso individual foi encontrado que apresentasse significativamente menos rosado do que o

restante da população investigada. Conclui-se conseqüentemente que dentro dos tipos de alface cultivados não há, ou, há apenas uma variação genética muito limitada para a descoloração rosada induzida por ferimento.

Demonstrou-se, ainda que, de acordo com invenção, um inibidor específico da PPO, L-cisteína, quando aplicado durante a reação, reprimiu fortemente a formação da pigmentação rosada. Além disto, descobriu-se que a formação da pigmentação rosada foi inibida pelo cinamaldeído, que é um inibidor da atividade da PAL e do acastanhamento da alface recém-colhida (Fujita, N. e outros (2006) Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 672-676). Estes resultados mostraram que a resposta rosada da descoloração da alface é dependente da PAL e da PPO.

Sabe-se que o acastanhamento enzimático da alface recém-colhida pode ser impedido muito eficazmente pela aplicação de um rápido choque termal. O efeito observado pode ser explicado supondo-se redistribuição da biosíntese da proteína do caminho fenil propanóide para as proteínas do choque termal reduzindo, deste modo, o fluxo metabólico para a formação de polifenóis.

Alternativamente, o efeito pode ser explicado supondo-se que as enzimas envolvidas na oxidação do polifenol, tais como a PPO e a POD, são inativadas pelo tratamento de choque termal. Quando o choque termal foi aplicado à alface, que foi analisada subseqüentemente para a resposta rosada, foi mostrado que esta resposta, bem como o acastanhamento enzimático, foram inibidos eficazmente. Isto demonstra que a resposta rosada da alface, que é parte desta invenção é fisiologicamente muito similar ao acastanhamento enzimático bastante conhecido.

Esta descoberta foi consubstanciada posteriormente, aplicando-se L-cisteína como um agente redutor. A L-cisteína além de ser um inibidor da PPO, é conhecida igualmente por reagir com o-quinonas coloridas e por convertê-las de volta em difenóis incolores em uma reação química de

redução. Quando a pigmentação rosada formada por discos de folha da alface é tratada com a L-cisteína, demonstrou-se que o composto rosado foi convertido em um composto incolor. Parece, conseqüentemente, que seja provável que a pigmentação rosada seja uma o-quinona formada pela PPO.

Isto foi corroborado pela descoberta de que agentes redutores, como o ácido ascórbico ou a glutationa, igualmente convertem a pigmentação rosada em um composto incolor.

Além disto, quando plantas que foram colhidas no campo apresentando rosado são tratadas com L-cisteína, a descoloração rosada é igualmente eliminada. Isto demonstra que a resposta rosada do disco de folha representa o fenômeno de rosado natural, que pode algumas vezes ser visto nas plantas cultivadas sob condições de campo.

Um modo de realização adicional desta invenção é baseado na experiência a seguir. Partes de uma folha de uma cabeça da alface são produzidas por corte e incubadas a 16°C no ar. Como uma resposta, a superfície de ferimento torna-se castanha após, aproximadamente, 4 dias. Especialmente na superfície de ferimento da nervura principal, o acastanhamento pode claramente ser observado. Além disso, a reação de acastanhamento pode igualmente ser observada, a nível de toda a planta, sobre folhas danificadas pelo corte ou pela abrasão.

Todas estas reações de acastanhamento podem ser completamente inibidas pela L-cisteína, um inibidor da PPO, que demonstra que estes fenótipos são manifestados através da atividade da PPO e podem, conseqüentemente, ser considerados diagnósticos para o acastanhamento pós-colheita, como observado durante o processamento e embalagem da alface.

Estas reações de acastanhamento induzidas por ferimento podem ser geradas de uma maneira eficiente que pode ser explorada em um procedimento de triagem fenotípica para identificar plantas mutantes que tenham potencial de acastanhamento induzido por ferimento reduzido.

Um modo de realização adicional desta invenção é baseado na descoloração em superfícies de ferimento de tecidos da alface, ou na reação de cor observada no, sobre, ou próximo de tecidos intatos da alface, tais como, tegumentos de semente da alface, induzidos pela aplicação de substratos que podem ser convertidos pelas enzimas de oxidação do fenol em compostos coloridos.

Por exemplo, quando os discos de folha da alface são incubados com um substrato da PPO L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), uma descoloração castanho escuro a preto é observada na superfície de ferimento que é a manifestação da formação de melanina através da PPO. Quando a L-cisteína foi aplicada simultaneamente, a descoloração preta foi totalmente inibida o que confirma a suposição de que esta descoloração é mediada pela PPO.

Embora L-DOPA não seja considerada um substrato natural para a PPO da alface, ela pode ser útil nas análises direcionadas para a identificação de mutantes que apresentam descoloração induzida por ferimento reduzida.

De maneira similar à descrita para L-DOPA, outros substratos podem ser aplicados a fim de provocar uma resposta de descoloração. Estes incluem, mas não de modo limitativo, o ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, L-tirosina, e catecol.

Tomada em conjunto, a formação de pigmentações diferentes nas superfícies geradas nas plantas monitora modificações em um caminho que começa pela indução de um sinal de ferimento, canalizado através da PAL e da PPO, e levando à descoloração. Como descritas, estas reações de descoloração induzida por ferimento podem ser prontamente avaliadas por inspeção visual, o que permite um procedimento de triagem muito eficiente da mutante. A lógica em que se baseia o método descrito por esta invenção está ilustrada na Figura 1.

De acordo com esta invenção, descobriu-se, assim, que o caminho da descoloração induzida por ferimento de discos de folha, in vitro, justapõe-se amplamente com a descoloração induzida por ferimento da alface processada em escala industrial e pode, conseqüentemente, ser considerado diagnóstico para este processo. Isto é corroborado pela noção que os inibidores da PAL ou da PPO inibem o acastanhamento enzimático da alface processada e embalada sob condições práticas, industriais. Significativamente, uma vez que o procedimento compreende a etapa de indução isto é, ferimento e uma das conversões metabólicas finais mediadas pela PPO, o procedimento permite capturar todos os fatores genéticos direta ou indiretamente envolvidos neste processo fisiológico. Além disso, como esta resposta pode ser gerada usando-se uma gama inteira de tecidos de folha das folhas de estágios de desenvolvimento diferentes, triagens de mutantes podem ser direcionadas para estes estágios ou tecidos diferentes quando considerado relevante.

Plantas mutantes, que foram identificadas como tendo sido modificadas no que diz respeito ao processo fisiológico levando de uma descoloração por ferimento a uma dependente da PAL e da PPO baseada em um ou mais das análises fenotípicas descritas acima, podem ser adicionalmente caracterizadas. Esta caracterização pode ser feita a níveis diferentes, por exemplo, a nível molecular, bioquímico, fisiológico e fenotípico.

É óbvio àqueles peritos na técnica que níveis variáveis de descoloração podem ser observados, o que pode refletir a presença de lócus mutantes diferentes ou formas alélicas diferentes de lócus idênticos afetando a feição da descoloração na população original.

Em caso das mutações recessivas, estas duas possibilidades podem ser facilmente distinguidas pela execução de testes de alelismo, que compreende o cruzamento de duas plantas mutantes e a determinação do fenótipo do híbrido. No caso de alelismo das mutações, a feição reduzida da

descoloração será aparente em F1 enquanto que, no caso do fenótipo nos mutantes, é determinada por lócus recessivo diferente, o que não seria o caso.

Uma vez que, em um modo de realização da invenção, mutagênese aleatória é aplicada para gerar a população inicial, mutações no fundo genético podem, igualmente, contribuir para a variação do fenótipo sob condições experimentais. A fim de discriminar entre mutações exclusivas de resistências diferentes e um efeito combinado de mutações no fundo genético, retrocruzamentos deveriam ser executados para criar fundos genéticos uniformes para eventos diferentes de descoloração reduzida.

Este procedimento é adicionalmente relevante para determinar se mutações em lócus específicos, envolvidos em descoloração induzida por ferimento, apresentam efeitos pleiotrópicos.

As plantas M2 assim selecionadas com base em uma resposta reduzida da descoloração são usadas para cultivar as sementes M3. Subseqüentemente, as linhas endogâmicas descendentes de eventos de descoloração reduzida são reavaliadas para sua resposta reduzida ao ferimento. Além disto, o acastanhamento ou rosado reduzido pode ser avaliado em fundos genéticos diferentes e sob condições diferentes de cultivo da colheita e do processamento. Os métodos de triagem da invenção podem ser usados para todas estas avaliações.

Estudos bioquímicos podem ser executados para tratar de questões relacionadas aos caminhos afetados pela modificação genética. Estudos moleculares podem ser executados para determinar se os genes de candidatos putativamente envolvidos na resposta de acastanhamento enzimático ou rosado como genes codificando a PAL, PPO ou peroxidases, foram modificados. Análise genética pode, além disto, ser realizada para demonstrar se a modificação encontrada em um gene de candidato é causal em relação ao fenótipo alterado.

Embora mutagênese induzida seja o método preferido de

prover uma população de planta a ser usada no método de triagem desta invenção, uma pessoa experiente na técnica sabe que existe tecnologia que permite modificar genes-alvo residentes no genoma de uma planta de uma maneira específica. Por exemplo, tem sido demonstrado que oligonucleotídeos quiméricos são agentes mutagênicos eficazes com um modo específico de ação.

Outra abordagem é modificar genes-alvo via recombinação homóloga ou alvejamento do gene. Usando-se esta abordagem, um fragmento de um gene é trocado por um fragmento introduzido do ADN contendo uma modificação desejada. Abordagens transgênicas são igualmente praticáveis, pelas quais os genes modificados do alvo são introduzidos para competir com o produto endógeno. Isto pode levar a efeitos negativos dominantes. Além disso, a regulação decrescente específica da expressão dos genes é praticável com a interferência do RNA.

No caso dos oligonucleotídeos mutagênicos, o alvejamento do gene ou abordagens transgênicas são usados para modificar um fator genético envolvido na resposta da descoloração induzida por ferimento, obviamente, a estrutura primária dos genes relevantes deveria ser conhecida.

Quando plantas da progênie de mutantes particulares, cultivadas de sementes obtidas via autofertilização, são analisadas pelo rosado, uma redução similar à encontrada para o mutante originalmente identificado é observada. Isto demonstra que uma resposta da descoloração rosada reduzida pode ser hereditária e provocada por uma modificação do genoma.

Uma descoberta ainda mais surpreendente foi o fato de que quando as plantas da progênie de mutantes, identificadas como apresentando uma descoloração reduzida induzida por ferimento, são cultivadas à maturidade e testadas para acastanhamento enzimático de tecido lesionado da nervura central, esta resposta é também fortemente inibida. Isto mostra que a

análise do rosado do disco de folha está causalmente relacionada ao acastanhamento enzimático na alface e que a análise do rosado pode ser usada para prognosticar o nível de acastanhamento enzimático de uma planta de alface madura.

Conseqüentemente, a análise do rosado do disco de folha pode ser usada como uma ferramenta da triagem para identificar plantas da alface com um potencial de acastanhamento enzimático reduzido. Esta ferramenta pode ser usada para identificar plantas da alface com potencial de acastanhamento enzimático reduzido de qualquer tipo de população de planta independentemente da causa da variação genética, que reside nesta população. Por exemplo, além das populações de ems, alguém pode usar acessos naturais ou populações de cultivos.

O método de triagem também pode ser usado para triar outras plantas que apresentem descoloração induzida por ferimento.

Um ou mais dos métodos de triagem providos por esta invenção pode, por exemplo, ser aplicado a qualquer espécie da planta para a qual a qualidade de processamento pós-colheita precisar de melhoria. Além da alface cultivada esta invenção pode igualmente ser aplicada a outras espécies de planta, por exemplo, pertencentes às Asteraceae, bem como à espécie selvagem do gênero Lactuca ou às espécies de plantas pertencentes ao gênero de planta Cichorium ao qual espécies como endívia (Cichorium endívia), chicória e escarola (Cichorium intybus) pertencem. Além disso, outras plantas de cultivo tais como maçã, chicória, batata, batata doce, aipo, cogumelos, banana, abacate, pêssego, pêra, damasco, manga, berinjela, e para flores ou caules de flor, tais como caules de gérbera, flores de crisântemo, fundos de alcachofra etc. podem ser triadas com os métodos da invenção.

A presente invenção refere-se a um método para detectar uma característica fenotípica em uma planta pela execução dos métodos de triagem que são aqui apresentados. A presença da característica é determinada por

meio de um ou mais de três testes de descoloração, a saber, a ocorrência de rosado ou do acastanhamento ou a capacidade de converter um substrato em um pigmento colorido, como L-DOPA em melanina.

O "controle" como usado aqui é qualquer planta que se sabe que apresenta uma ou mais das reações de descoloração rosada, de acastanhamento, e conversão de L-DOPA em melanina, cujas reações podem ser inibidas pela L-cisteína ou pelo cinamaldeído. Apropriadamente, uma planta é usada, da qual um disco de folha ou outra parte de planta quando incubado entre papel de filtro umedecido a 5°C por 7 dias apresenta descoloração rosada em torno das bordas do disco ou da parte.

A presente invenção será adicionalmente ilustrada pelos Exemplos a seguir e que não pretendem limitá-la de nenhuma maneira. Os Exemplos referem-se a discos de folha da alface e sementes, Cichorium e berinjela, mas, em vez de alface, outras plantas ou partes delas, em particular frutas e verduras frescas, podem ser usadas. Nos Exemplos, referência é feita às figuras a seguir.

Figura 1: Esboço esquemático da lógica por trás do projeto do procedimento de triagem do mutante das populações de alface para descoloração enzimática reduzida pós-colheita. O sinal de entrada da triagem é o ferimento do tecido da folha, que é detectada pela planta e que gera uma resposta de sinalização divergente que leva a vários processos fisiológicos incluindo senescência, respiração e descoloração do tecido. Este sinal de entrada pode ser combinado com a aplicação de compostos fenólicos como substratos da PPO.

O sinal de saída da triagem é uma descoloração acastanhada ou rosada, dependendo das condições aplicadas, do diagnóstico da superfície de ferimento para acastanhamento e rosado pós-colheita. Isto é pressuposto pelo fato do sinal de saída estar completamente inibido por cinamaldeído e L-cisteína, que são inibidores específicos da PAL e da PPO, respectivamente.

Figura 2: Imagem representativa do fenótipo de saída da triagem baseada na descoloração rosada de discos de folha. Os discos de folha das plantas da alface (1 disco por planta) são arranjados entre papéis de filtro umedecidos e incubados a 5°C por 7 dias. Uma descoloração rosada pode ser claramente observada em torno de cada disco de folha na superfície de ferimento.

Figura 3: Análise do rosado do disco de folha (4 discos por prato) realizada na presença de concentrações diferentes de cinamaldeído inibidor da PAL. O número acima de cada um dos pratos mostra os % de cinamaldeído usados.

Figura 4: Efeito inibitório da L-cisteína, inibidor a PPO na descoloração rosada dos discos de folha da alface (4 discos por prato) incubados entre papéis de filtro umedecidos. O número acima de cada prato mostra os % de L-cisteína usados.

Figura 5: Efeito inibitório da L-cisteína, inibidor da PPO na descoloração preta dos discos de folha da alface (4 discos, por rato) incubados entre papéis de filtro umedecidos na presença de L-DOPA 1,5 mM. O número acima de cada prato mostra a concentração usada de mM de L-cisteína.

Figura 6: Efeito do pré-tratamento por choque termal em rosado do disco de folha da alface. O choque termal foi aplicado por 90 segundos nas folhas intatas na temperatura indicada em cada prato.

Figura 7: Conversão da pigmentação rosada formada pela resposta ao ferimento da alface em um composto incolor pela L-cisteína. A fileira superior dos pratos mostra a análise de L-DOPA enquanto que a fileira inferior dos pratos mostra a análise do rosado Os mais baixos de dois discos em cada prato foram tratados com L-cisteína depois que a resposta ao ferimento terminou. A concentração de L-cisteína usada foi 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 e 10 mM, que está indicada acima.

Figura 8: Redução do rosado na alface cultivada carregada

com L-cisteína. O painel superior mostra sintomas típicos do rosado de uma folha da alface colhida de uma planta, que foi extremamente estressada por saturação com água As nervuras principais mostram a presença de uma pigmentação rosada. O painel inferior direito mostra um disco coletado da folha que mostra sintomas de rosado após o tratamento com L-cisteína 1 mM por 30 minutos na temperatura ambiente. O painel inferior esquerdo mostra um disco de folha similar após o tratamento com água por 30 minutos na temperatura ambiente.

Figura 9: Painel A: Análise fenotípica das plantas M2 individuais da alface (agrupadas em lotes) para descoloração do disco de folha de acordo com o método descrito por esta invenção. Um total de 138 amostras de 12000 é mostrado neste painel das quais a indicada por uma seta apresentou descoloração rosada fortemente reduzida. Painel B: Novo teste do indivíduo selecionado indicado no painel A confirmou a quase ausência de formação da descoloração rosada (amostra na posição média) em comparação às amostras de controle que apresentaram uma resposta da descoloração clara.

Figura 10: Fenótipos de plantas M2 da alface. As plantas etiquetadas 1, 2, 4, 5, 7, 10 e 12 apresentaram descoloração rosada reduzida do disco de folha usando-se a análise de acordo com esta invenção. As plantas 3, 6, 8, 9, e 11 sãos plantas, que apresentaram um nível de descoloração rosada do disco de folha comparável ao controle do tipo selvagem. A planta 1 é o único exemplo de um mutante que apresentou uma redução forte na descoloração rosada e em um habitus normal de cultivo. As plantas 2, 4, 5, 7, 10 e 12 apresentaram descoloração rosada reduzida e um fenótipo apequenado, descorado.

Figura 11: Teste da progênie de um mutante da alface mostrando uma descoloração reduzida. À esquerda, 25 amostras de controle são mostradas apresentando uma resposta normal da descoloração induzida por ferimento. À direita, um grupo de amostra é mostrado coletadas de uma

série de 35 plantas da progênie derivada de um único mutante, que tiveram suas respostas da descoloração induzida por ferimento reduzidas severamente.

Figura 12: Imagem representativa do fenótipo de saída da triagem baseado na descoloração acastanhada de partes da nervura central da folha coletadas de plantas maduras da alface. A foto mostra discos do tecido externo da nervura central da folha da alface após incubação por 3 dias a 16°C. A descoloração acastanhada típica pode claramente ser observada na superfície de ferimento. Cada prato contém 3 discos coletados em posições diferentes da nervura central (verde, verde claro e branco). O número acima do prato indica a concentração em mM de L-cisteína que foi adicionada ao filtro.

Figura 13: Conversão de L-DOPA na superfície da folha da alface em melanina. O painel A mostra a análise em uma solução de L-DOPA 1,5 mM. O tubo superior é o controle negativo, os outros 3 tubos são idênticos. O painel B mostra o resultado da incubação de discos de folha entre papéis de filtro umedecidos contendo L-DOPA 1,5 mM.

Figura 14: Teste da progênie de um mutante da alface que apresenta uma descoloração rosada reduzida induzida por ferimento no acastanhamento da nervura central. O painel A mostra os discos da nervura central de 8 plantas da progênie, numerados 1 a 8 (3 discos por planta) do mutante com rosado reduzido. O painel B mostra os discos da nervura central de 8 plantas de controle numerados de 9 a 16 (3 discos por planta) que apresentaram uma resposta normal de acastanhamento.

Figura 15: Avaliação de um mutante da alface que apresenta uma resposta reduzida de descoloração rosada induzida por ferimento ou acastanhamento após o corte e embalagem sob atmosfera ambiente. Partes de folha da cabeça de uma planta de controle são mostradas à esquerda e partes da folha do mutante com descoloração reduzida são mostradas à direita. O material da folha recém-colhida foi armazenado por 6 dias a 4°C. A

descoloração acastanhada pôde ser claramente observada nas amostras de controle enquanto que as amostras do mutante permaneceram imutáveis.

Figura 16: Análise do rosado na Cichorium endívia (painel esquerdo) e na Cichorium intybus (painel direito).

Figura 17: Análise com ácido clorogênico em discos de folha da alface.

Figura 18: Resposta do acastanhado na berinjela cortada.

Figura 19: Análise de L-DOPA em sementes da alface (fileira superior) e berinjela (fileira inferior).

Figura 20: Análise de L-DOPA em sementes germinadas da alface.

Figura 21: Análise do catecol em sementes germinadas da alface.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Modificação genética da alface usando-se ems

Aproximadamente 2000 sementes das variedades da alface Troubadour, Apache, Yorvik.e Roderick foram incubadas em uma solução ventilada de 0.05% (w/v) ou 0.07% (w/v) ems durante 24 horas na temperatura ambiente. Após o tratamento do ems as sementes Ml foram enxaguadas com água e plantadas em uma estufa a 20°C por em regime de 16 horas com luz, 8 horas no escuro para cultivar as plantas maduras e caule e floração induzidos para produzir sementes M2. Após a maturação, as sementes M2 foram colhidas, inchadas e armazenadas até uso posterior. A freqüência da mutação foi estimada com base no número relativo de plantas individuais com um fenótipo descorado que foram perturbadas na biosíntese da clorofila.

EXEMPLO 2

Desenvolvimento de um diagnóstico de triagem fenotípica para a

descoloração induzida por ferimento da alface baseada na formação de pigmento rosado

Uma análise fenotípica foi desenvolvida na qual a descoloração induzida por ferimento da folha da alface pôde ser prontamente avaliada. Esta abordagem permite a triagem da planta nova para descoloração. Discos de folha com diâmetro de 5mm foram coletados de plantas jovens, ou maduras e colocados entre papéis de filtro umedecidos em uma bandeja. O sistema foi incubado a 5°C por 7 dias. Durante a incubação uma pigmentação rosada desenvolveu-se no local lesionado do disco de folha e tornou-se claramente visível como um círculo impresso no papel de filtro (Figura 2).

A fim de demonstrar que a produção da pigmentação rosada exige um caminho fenilpropanóide ativo, os efeitos dos inibidores da PAL (cinamaldeído, Figura 3) e da PPO (L-cisteína, Figura 4) foram testados neste análise. Quando o cinamaldeído foi aplicado durante a análise, a descoloração rosada foi completamente inibida em uma concentração de 0,01% ou mais alta.

Um resultado semelhante foi obtido usando-se L-cisteína em uma concentração de 0,001% e mais alta, enquanto outros aminoácidos como a L-leucina ou L-alanina não apresentaram nenhum efeito. Isto demonstra que a L-cisteína pode inibir a resposta rosada dos discos da folha da alface e que o efeito inibitório da L-cisteína é específico.

A fim de demonstrar que a L-cisteína está atuando verdadeiramente como um inibidor da atividade da PPO neste sistema, os discos de folha da alface foram incubados com substrato da PP0 L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Embora L-DOPA não seja considerada, um substrato natural para a PPO da alface, uma descoloração castanho escuro a preto foi observada na superfície de ferimento que é a manifestação da formação de melanina via PPO. Quando 1 mM ou uma concentração mais alta de L-cisteína foi aplicada simultaneamente, a descoloração foi inibida

completamente segundo as indicações da Figura 5.

A resposta rosada do disco de folha da alface foi adicionalmente caracterizada pela aplicação de um choque termal antes de induzir a resposta ao ferimento. Folhas destacadas foram incubadas durante 90 segundos a 21, 40, 50 e 60°C. Após este tratamento, discos de folha foram coletados e analisados para o rosado. A resposta rosada foi inibida completamente quando o choque termal foi realizado à temperatura de 50°C ou mais alta. Este resultado é mostrado na Figura 6.

Como a L-cisteína é conhecida por reagir com as o-quinonas, que são produtos da PPO, convertendo-os de novo em difenóis incolores, os efeitos da L-cisteína na pigmentação rosada que vem dos discos da folha da alface foram determinados. Paralelamente, o efeito da L-cisteína foi determinado na formação da melanina pela incubação com L-DOPA.

Discos de folha foram coletados e incubados de acordo com os procedimentos descritos acima. Depois que a resposta do ferimento foi completada, uma série da concentração de L-cisteína foi adicionada ao disco de folha e a mudança na cor foi monitorada. O resultado é mostrado na Figura 7. A experiência demonstrou claramente que a L-cisteína estava convertendo a pigmentação rosada de novo em um composto incolor, enquanto que a melanina preta formada na análise de L-DOPA não foi afetada pela L-cisteína. Isto demonstra que a pigmentação rosada é, muito provavelmente, uma o-quinona formada pelo sistema de oxidação do polifenol da alface.

Para demonstrar que a resposta in vitro observada reflete uma resposta que é fisiologicamente relevante, a descoloração baseada em L-cisteína foi aplicada no material de planta cultivada no campo. Isto foi realizado colhendo-se uma folha de uma planta da alface cultivada no campo apresentando severos sintomas de rosado ao longo das nervuras. Isto é observado, tipicamente, quando as plantas foram forçadas, por exemplo, em condições de saturação severa com água. A folha foi usada para preparar os

discos de folha que foram incubados imediatamente com L-cisteína 1mM. Após uma incubação de, aproximadamente, 30 minutos à temperatura ambiente, a descoloração rosada desapareceu, segundo as indicações da Figura 8.

Considerados em conjunto, estes dados experimentais mostram que discos de folha da alface podem ser induzidos por ferimento para produzir descoloração rosada que é dependente da PAL e da PPO. Este fenótipo permite um procedimento de triagem eficiente e eficaz para os mutantes da alface que têm uma resposta de descoloração induzida por ferimento modificada canalizada via PAL, PPO ou ambos.

EXEMPLO 3

Triagem para mutantes com descoloração reduzida induzida por ferimento

A fim de identificar mutantes da alface com baixo potencial de acastanhamento enzimático ou rosado induzido por ferimento, a análise do disco de folha descrito no Exemplo 2 foi aplicada às plantas de uma população de alface mutante.

Doze mil plantas foram cultivadas em uma estufa (Localização: De Lier, semeadura em 28 de março, plantio em 18 de abril; crescimento sob condições de cultivo regular da alface) e, de cada planta individual, foi coletado um disco de folha (amostragem de 15 de maio em diante) e incubadas como grupos de (em média) 25 amostras entre papéis de filtro umedecidos a 5°C por 7 dias. Um escore visual foi atribuído a cada disco de folha dependendo da intensidade da descoloração rosada. Com base nesta avaliação, as plantas foram triadas naquelas cujos discos de folha ou não apresentaram, ou apresentaram um grau relativamente baixo de descoloração da superfície de ferimento. A planta com traços mal visíveis de descoloração foi numerada como 06D.210202.

Das 12000 plantas, 1 planta foi finalmente selecionada, a que

apresentou apenas traços de descoloração dificilmente visíveis e 11 que apresentaram um nível relativamente de baixo de descoloração. O resultado de uma destas análises é mostrado na Figura 9.

A análise da descoloração foi repetida para os 12 indivíduos inicialmente selecionados e para a maioria dos casos individuais o resultado original foi, confirmado. Somente indivíduos confirmados foram selecionados para uma análise posterior e produção de semente.

EXEMPLO 4

Triagem para mutantes com uma descoloração reduzida induzida por ferimento

A fim de identificar mutantes da alface com baixo potencial de acastanhamento enzimático induzido por ferimento a análise do disco da folha descrito no Exemplo 2 foi aplicado às plantas de uma população da alface mutante. 8500 plantas foram cultivadas em uma estufa até 3 semanas de idade (estágio de folha 6-8) e de cada planta individual um disco de folha foi coletado e incubado entre papéis de filtro umedecidos a 5°C por 7 dias.

Foi atribuído um placar visual para cada disco de folha, dependendo da intensidade da descoloração rosada. Com base nesta avaliação, as plantas foram triadas naquelas cujos discos de folha não apresentaram, ou apresentaram, um grau relativamente baixo de descoloração da superfície de ferimento. Das 8.500 plantas, 8 plantas que não apresentaram nenhuma descoloração visível foram triadas, bem como, 10 que apresentaram descoloração relativamente baixa. A análise da descoloração foi repetida para os 18 indivíduos que foram inicialmente selecionados e para a maioria dos casos individuais o resultado original foi confirmado. Doze indivíduos são mostrados na Figura 10. Somente os indivíduos confirmados foram selecionados para uma análise posterior e produção de semente. Uma planta mutante sem efeitos pleiotrópicos colaterais (por exemplo, descoramento, encolhimento de tamanho) foi numerada como 05D.202539. A semente

produzida por autopolinização desta planta foi numerada como 050.810596. A semente produzida por autopolinização de três plantas cultivadas de sementes da 05D.810596 foram numeradas como 07G.9979 e depositadas em NCIMB. O número NCIMB é 41441 (depositado aos 10 de outubro de 2006).

EXEMPLO 5

Análise fenotípica de mutantes triados apresentando, descoloração reduzida induzida por ferimento

Dos 12 mutantes selecionados pela triagem apresentada no Exemplo 3, 6 apresentaram um fenótipo de crescimento e descoramento fortemente reduzidos. Outros mutantes desenvolveram-se normalmente, isto é, de acordo com o tipo da população inicial da experiência de mutagênese.

Os mutantes apequenados e descorados são provavelmente perturbados em função do cloroplasto. Uma vez que a PPO reside nestas organelas celulares isto pode explicar a resposta relativamente baixa nas análises do disco de folha. Porque estas mutações pleiotrópicas são indesejáveis, estes mutantes foram considerados como menos relevantes.

A planta mutante 06D.210202, que apresentou a redução mais forte da descoloração do disco de folha, apresentou fenótipo normal e a mutação é considerada, deste modo, específica para a descoloração sem efeitos pleiotrópicos fortes.

EXEMPLO 6

Confirmação da quase ausência de fenótipo de descoloração na descendência

Para demonstrar que a descoloração reduzida de mutantes da alface como a planta. 06D.210202 dos Exemplos 3 e 5 foi produzida por um efeito genético gerado pelo tratamento de mutagênese aqui descrito, semente foi produzida por autopolinização. A semente produzida por autopolinização da planta 06D.210202 foi numerada como 06D.819784. As sementes foram germinadas no solo e as plantas foram testadas para a descoloração usando-se

a análise do rosado do disco de folha.

Esta experiência mostrou claramente que o fenótipo alterado tinha uma base genética, uma vez que todas as plantas da progênie apresentaram um fenótipo similar, isto é, uma redução forte na descoloração rosada, como o mutante que foi usado para produzir as sementes. Este resultado está ilustrado na Figura 11.

A semente produzida por autopolinização de três plantas cultivadas das sementes da 06D.819784 foi numerada como 06D.863B2 e depositada em NCIMB. O número NCIMB é 41454 (depositado aos 3 de janeiro de 2007).

EXEMPLO 7

Desenvolvimento de um diagnóstico de triagem de fenotípico para a descoloração induzida por ferimento da alface baseada na formação do pigmento acastanhado

As plantas da alface foram cultivadas à maturidade e partes de folhas externas foram coletadas cortando-se discos do tecido da nervura. Os discos foram incubados em papel de filtro umedecido a 16°C. Após aproximadamente 72 horas, a superfície de ferimento tornou-se acastanhada. Na presença de L-cisteína 10 mM a resposta de acastanhamento foi inibida indicando que a descoloração observada foi mediada pela PPO. Um resultado representativo desta experiência está mostrado na Figura 12. Uma vez que a resposta como indicada na Figura 12 é uma resposta de acastanhamento mediada da PPO, o procedimento de triagem como descrito neste exemplo pode ser considerado como eficaz e imparcial para triar mutantes apresentando descoloração acastanhada reduzida que ocorra durante o processamento da alface.

EXEMPLO 8

Desenvolvimento de um diagnóstico de triagem fenotípica para a descoloração induzida por ferimento da alface baseada na conversão de

L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) em um pigmento preto chamado melanina

Além das análises que tratam a descoloração induzida por ferimento de maneira ampla, o método, de acordo com esta invenção, igualmente permite triar de maneira mais específica mutantes que têm uma atividade reduzida da PPO. Uma análise fenotípica que seja indicativa da atividade da PPO foi desenvolvida usando-se discos de folha que foram incubados na presença de L-DOPA 1,5 mM. Uma vez a descoloração preta tornada aparente pôde-se concluir que L-DOPA pode prontamente ser convertida pelo sistema de oxidação de polifenol na superfície de ferimento das folhas da alface em um pigmento preto chamado melanina. L-DOPA é convertida pela PPO em L-DOPA-quinona reativa que é convertida não-enzimaticamente via dopacromo e indol quinona em melanina preta.

Além disso, mostrou-se, que a reação pode ser inibida adicionando-se L-cisteína 1 mM durante a reação (Figura 5). Conseqüentemente, esta análise permite a identificação de mutantes que são modificados pela capacidade de criar uma atividade da PPO em uma superfície de ferimento de uma folha. A resposta de discos de folha da alface à presença de L-DOPA pode ser observada tanto na solução quanto entre papéis de filtro umedecidos como mostrado na Figura 13.

EXEMPLO 9

Avaliando a descendência de um mutante apresentando uma quase ausência de descoloração por resposta reduzida de acastanhamento usando-se análise do acastanhamento do disco de nervura

Para demonstrar que a descoloração reduzida de mutantes da alface como a planta número 06D.210202 dos exemplos 3, 5 e 6 que tem descoloração rosada de superfícies de ferimento de discos de folha significativamente reduzida é, também, efetivamente reduzida na resposta de acastanhamento induzida por ferimento, uma progênie de várias plantas foi

cultivada à maturidade.

Nesta etapa do desenvolvimento, 3 discos da nervura central foram coletados das folhas externas de várias plantas da progênie. Estes discos da nervura foram incubados de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 7. Foi mostrado que as plantas da progênie do mutante que inicialmente foram apresentadas como fortemente reduzidas na descoloração rosada induzida por ferimento foram, também, fortemente reduzidas no acastanhamento da nervura central induzido por ferimento. O resultado desta experiência está mostrado na Figura 14.

EXEMPLO 10

Avaliando a descendência de um mutante apresentando quase ausência de descoloração por resposta reduzida do acastanhamento usando-se cabeças de alfaces recém-colhidas embaladas em sacos de plástico

Cabeças maduras das plantas da alface cultivadas da semente número 06D.819784 do Exemplo 6, que tem descoloração rosada de superfícies de ferimento de discos de folha significativamente reduzida, foram cortadas em partes usando-se uma faca e embaladas em um saco de plástico contendo atmosfera ambiente. Plantas de controle que apresentaram uma resposta normal da descoloração rosada do disco de folha foram tratadas de maneira idêntica. Os sacos foram armazenados a 4°C durante 6 dias, depois do que o material da folha foi avaliado para sua resposta de acastanhamento.

Foi mostrado, nesta experiência, que as plantas da progênie do mutante, que inicialmente foram apresentadas como fortemente reduzidas na descoloração rosada induzida por ferimento, foram também fortemente reduzidas no acastanhamento da nervura central induzido por ferimento quando processadas e armazenadas em sacos de plástico usando-se atmosfera ambiente. O resultado desta experiência está mostrado na figura 15.

EXEMPLO 11

Rosado na Cichorium

De modo a identificar mutantes com baixo potencial de rosado enzimático induzido por ferimento, a análise do disco de folha descrito no Exemplo 2 foi aplicada às plantas de uma população mutante de Cichorium. Os resultados são mostrados na Figura 16. Depreende-se que igualmente na Cichorium a reação rosada está presente. O método de triagem da invenção é assim uma ferramenta poderosa para triar as plantas da Cichorium que apresentam uma descoloração reduzida induzida por ferimento. Até aqui, a avaliação da resposta de acastanhamento na endívia e na endívia chicória apenas podia ser avaliada observando-se plantas maduras. O método da invenção que pode ser praticado em material de planta nova é muito eficiente e rápido.

EXEMPLO 12

Descoloração na berinjela

Berinjelas foram cortadas em metades e incubadas durante a noite na temperatura ambiente. Da Figura 18 depreende-se que a resposta da descoloração é causada principalmente pelas sementes. Assim, as sementes são um candidato apropriado para uma análise da descoloração baseada em um substrato, por exemplo, com L-DOPA.

EXEMPLO 13

Diagnóstico de triagem fenotípica para a descoloração induzida por ferimento da alface baseada na conversão do ácido clorogênico

Os discos de folha da alface foram incubados com ácido clorogênico 10 mM no papel de filtro. A Figura 17 mostra o acastanhamento dos discos. Com adição de L-cisteína a cor desapareceu mostrando novamente que a descoloração é dependente da PPO.

Este exemplo demonstra que o ácido clorogênico é um substrato apropriado para uma análise de triagem baseada em substrato.

EXEMPLO 14

Diagnóstico da triagem fenotípica baseada em substrato para a

descoloração induzida por ferimento para sementes

Sementes da alface e da berinjela foram incubadas com L-DOPA 0, 2,5 e 5 mM. A Figura 19 mostra que a reação de cor observada nas sementes é dependente da concentração. A resposta é dependente da PPO porque pode ser inibida com L-cisteína.

Sementes germinadas da alface foram incubadas com L-DOPA. A Figura 20 mostra que o tegumento da semente e a zona da raiz logo atrás da ponta da raiz apresentaram uma reação de cor. Esta reação de cor pode ser usada para triar sementes que apresentem uma descoloração reduzida.

Sementes da alface foram incubadas com 0, 100, 250, 500, 750 e 1000 mg/l de catecol. A Figura 21 mostra que as sementes apresentaram uma resposta de cor dependente da concentração. A resposta é dependente da PPO porque mostrou ser inibida pela L-cisteína.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para triar uma população de plantas ou partes de plantas quanto à presença de indivíduos apresentando uma descoloração reduzida em comparação a uma planta, ou parte de planta, de controle, caracterizado pelo fato de compreender:

a) prover uma população de plantas ou partes de plantas da população;

b) criar uma superfície de ferimento sobre as plantas ou partes de planta;

c) incubar a planta ou partes de plantas ou superfícies de ferimento criadas sobre as mesmas em um ambiente aquoso para permitir que ocorra descoloração nas, ou, sobre as mesmas;

d) observar a descoloração na, ou, sobre as plantas ou partes de plantas;

e) comparar a descoloração observada com aquela observada na planta ou parte de planta de controle para identificar plantas ou partes de plantas que não apresentam descoloração ou descoloração reduzida em comparação com a planta ou parte de planta de controle.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da descoloração ser descoloração induzida por ferimento.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato das plantas serem hortaliças, plantas frutíferas ou plantas florescentes.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato das plantas serem plantas de hortaliças selecionadas dentre alface, endívia, chicória endívia, batata, batata doce, aipo, cogumelos, alcachofra e berinjela.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato das plantas serem plantas frutíferas selecionadas dentre macieira,

bananeira, abacateiro, pessegueiro, pereira, damasqueiro e mangueira.

6. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato das plantas serem plantas florescentes selecionadas dentre gérbera e crisântemo.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato das plantas pertencerem à família de Asteraceae, em particular ao gênero Lactuca, mais em particular às espécies Lactuca sativa.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato das plantas pertencerem ao gênero Cichorium e, em particular, às espécies Cichorium intybus e Cichorium endivia.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato das partes de plantas serem selecionadas de folhas, cabeças, brotos, raízes, tubérculos, caules, flores, frutas, sementes, sementes germinadas, ou pedaços e células dos mesmos.

10. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato das partes de plantas serem discos de folha.

11. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato das partes de plantas serem discos de tecido de nervura central.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato da população de plantas ser uma população de plantas mutantes, uma coleção de germoplasma ou uma população de plantas transgênicas.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato da população de plantas mutantes ser obtida por um tratamento de mutagênese usando produtos químicos e/ou irradiação.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato do ambiente aquoso compreender papel de filtro umedecido.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato do ambiente aquoso compreender água ou uma solução.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato do ambiente aquoso conter um composto selecionado de L-3,4-dihidroxifenilalanina, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, L-tirosina e catecol.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato do ambiente aquoso conter um composto selecionado entre: ácido clorogênico (carne), catecol, catequina (casca), ácido caféico, glicosídeos de flavanol, 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), 3.4 ácido benzóico dihidroxila, p-cresol, 4-metil catecol, leucocianidina, ácido p-cumárico, ácido isoclorogênico, ácido caféico, 4 metil catecol, ácido clorogênico, catequina, epicatequina, pirogalol, catecol, flavonóides, derivados de ácido p-cumárico, 4-metil catecol, dopamina, pirogalol, catecol, ácido clorogênico, ácido caféico, DOPA, 3,4-dihidroxifeniletilamina (Dopamina), leucodelfinidina, leucocianidina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido cumárico, derivados de ácido cinâmico, tirosina, ácido caféico, derivados de ácido clorogênico, dopamina-HCl, catecol de 4 metil catecol, ácido caféico, catecol, catequina, ácido clorogênico, tirosina, DOPA, p-cresol, tirosina, catecol, DOPA, dopamina, adrenalina, noradrenalina, ácido clorogênico, pirogalol, 4-metil catecol, catecol, ácido caféico, ácido gálico, catequina, dopamina, ácido clorogênico, catecol, catequina, ácido caféico, DOPA, 3,4- ácido benzóico dihidroxila, p-cresol, ácido clorogênico, ácido caféico, catecol, DOPA, p-cresol, p-hidroxifenil, ácido propiônico, ácido pirúvico p-hidroxifenil, m-cresol, ácido clorogênico, ácido caféico e cafeilamida.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato da planta de controle ser uma planta da qual um

disco de folha, quando incubado entre duas lâminas de papel de filtro umedecido por 7 dias a 5°C apresentar uma descoloração rósea ao redor das bordas.

19. Método para triar uma população de plantas ou partes de plantas quanto à presença de indivíduos apresentando uma descoloração reduzida em comparação a uma planta de controle ou parte de planta, caracterizado pelo fato de compreender:

a) prover uma população de plantas ou partes de plantas da população;

b) incubar as plantas ou partes de plantas com um substrato que pode ser convertido em um pigmento colorido para permitir que a descoloração ocorra na, ou, sobre as mesmas.

c) observar a descoloração na, ou, sobre as plantas ou partes de plantas;

d) comparar a descoloração observada com aquela observada na planta ou parte de planta de controle para identificar plantas ou partes de plantas que não apresentam descoloração ou descoloração reduzida em comparação com a planta ou parte de planta de controle,

em que a planta ou parte de planta é ferida antes da incubação com o substrato e a descoloração do ferimento ou próximo ao ferimento é observada.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato do substrato ser selecionado dos compostos: ácido clorogênico (carne), catecol, catequina (casca), ácido caféico, glicosídeos de flavanol, 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), 3.4 ácido benzóico dihidroxila, p-cresol, 4-metil catecol, leucocianidina, ácido p-cumárico, ácido isoclorogênico, ácido caféico, 4 metil catecol, ácido clorogênico, catequina, epicatequina, pirogalol, catecol, flavonóides, derivados de ácido p-cumárico, 4-metil catecol, dopamina, pirogalol, catecol, ácido clorogênico, ácido caféico, DOPA, 3,4-

dihidroxifeniletilamina (Dopamina), leucodelfinidina, leucocianidina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido cumárico, derivados de ácido cinâmico, tirosina, ácido caféico, derivados de ácido clorogênico, dopamina-HCl, catecol de 4 metil catecol, ácido caféico, catecol, catequina, ácido clorogênico, tirosina, DOPA, p-cresol, tirosina, catecol, DOPA, dopamina, adrenalina, noradrenalina, ácido clorogênico, pirogalol, 4-metil catecol, catecol, ácido caféico, ácido gálico, catequina, dopamina, ácido clorogênico, catecol, catequina, ácido caféico, DOPA, 3,4- ácido benzóico dihidroxila, p-cresol, ácido clorogênico, ácido caféico, catecol, DOPA, p-cresol, p-hidroxifenil, ácido propiônico, ácido pirúvico p-hidroxifenil, m-cresol, ácido clorogênico, ácido caféico e cafeilamida.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser L-DOPA.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 21, caracterizado pelo fato da parte da planta ser um disco de folha.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato da descoloração poder ser inibida ou revertida por L-cisteína.

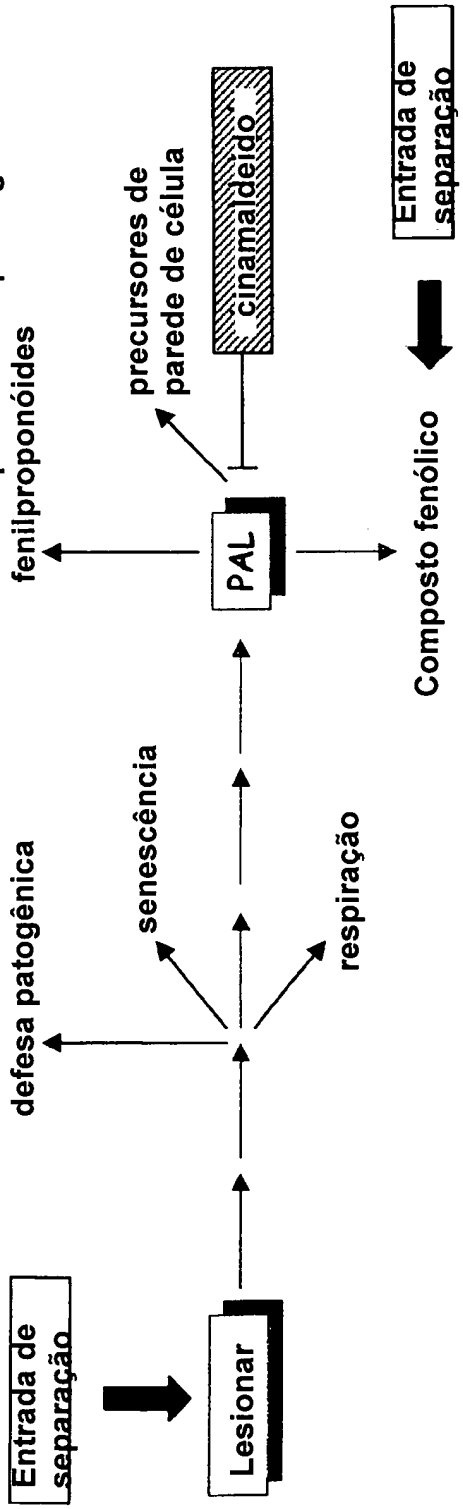

Entrada de separação
Lesionar
defesa patogênica
senescência
respiração
outros produtos de passagem fenilproponóides
precursores de parede de célula
cinamaldeído
PAL
Composto fenólico
Entrada de separação
L-cisteína
PPO
Descoloração
Saída de separação

FIG. 1

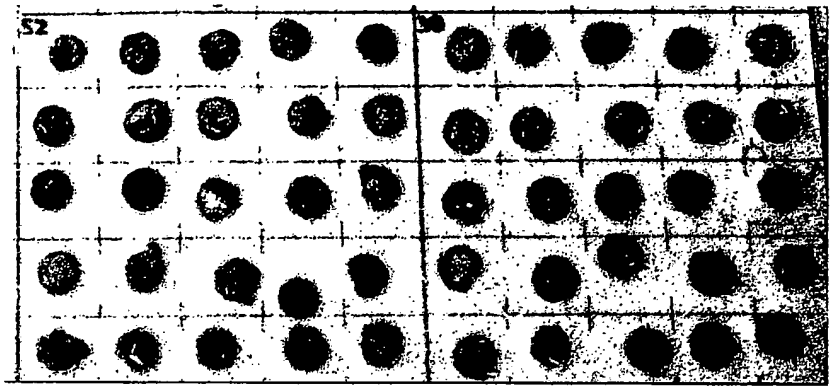


FIG. 2

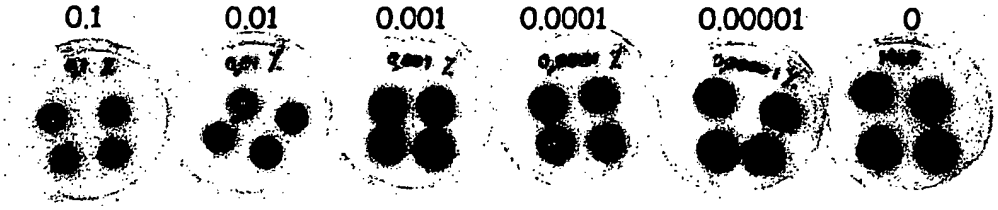


FIG. 3

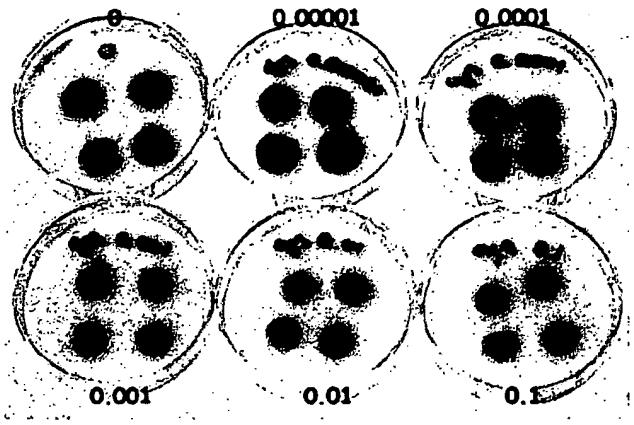


FIG. 4

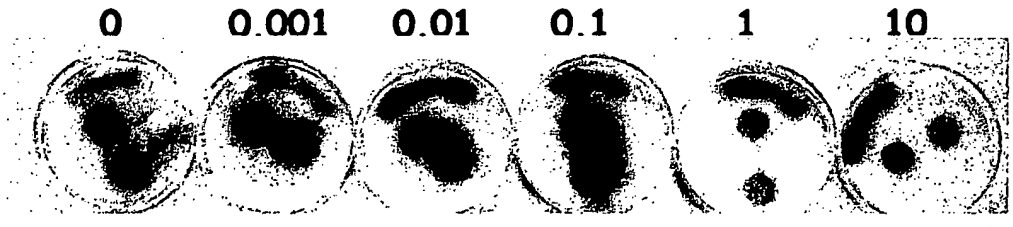


FIG. 5

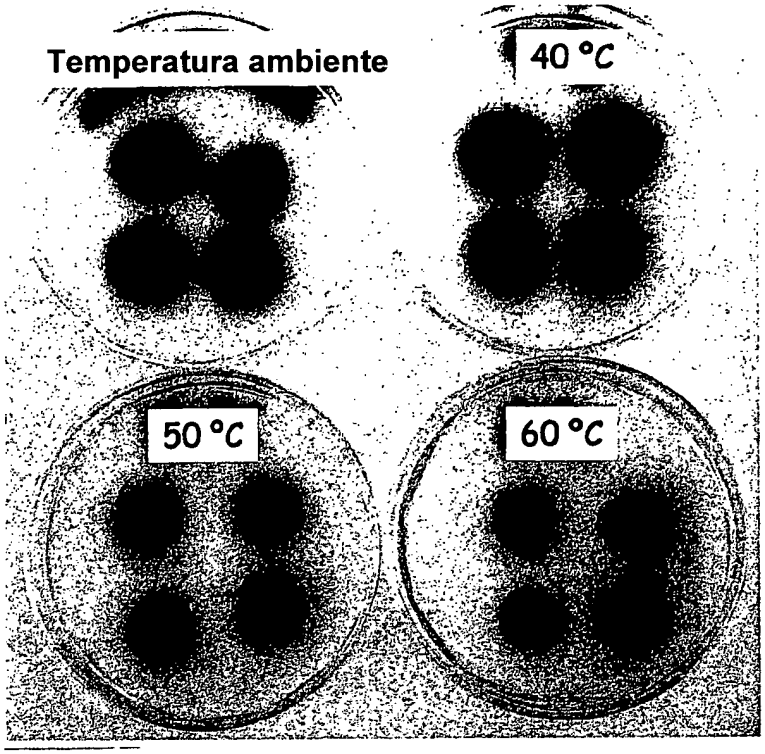


FIG. 6

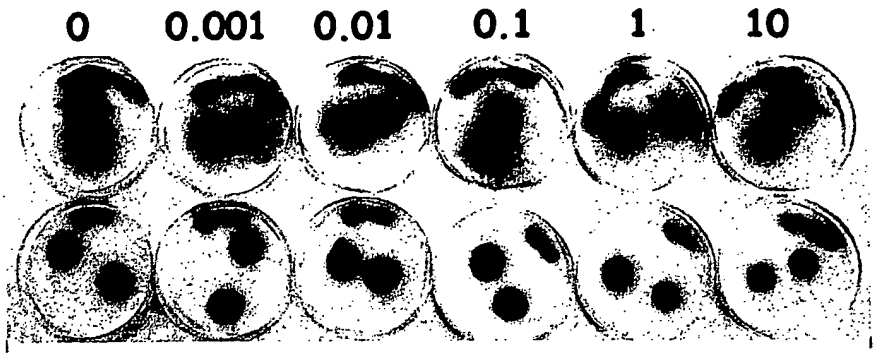


FIG. 7

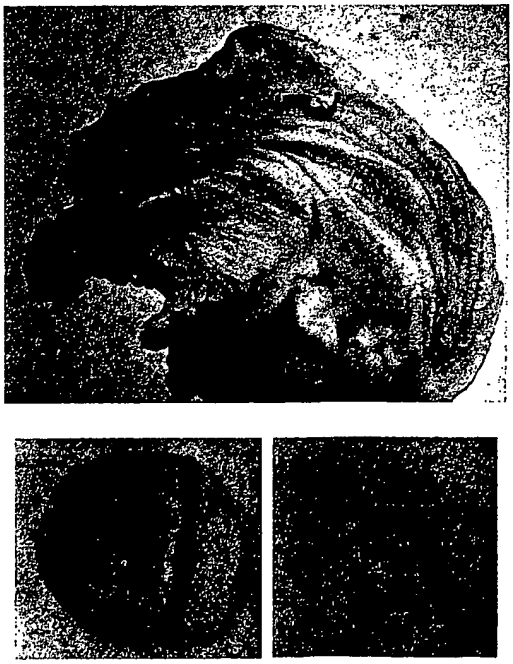


FIG. 8

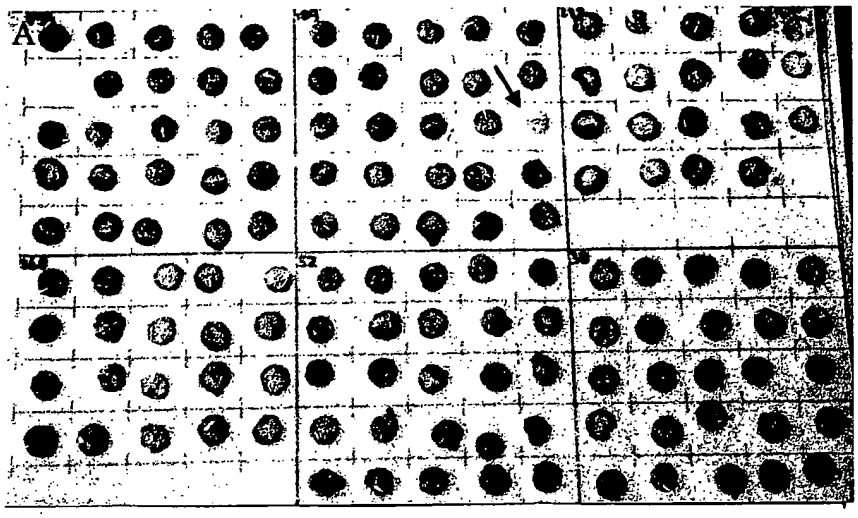


FIG. 9A

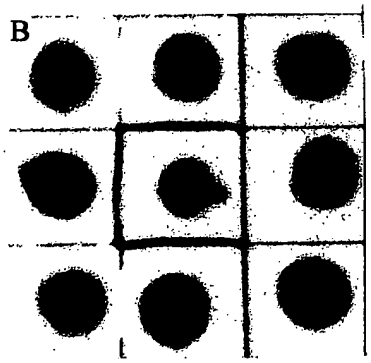


FIG. 9B

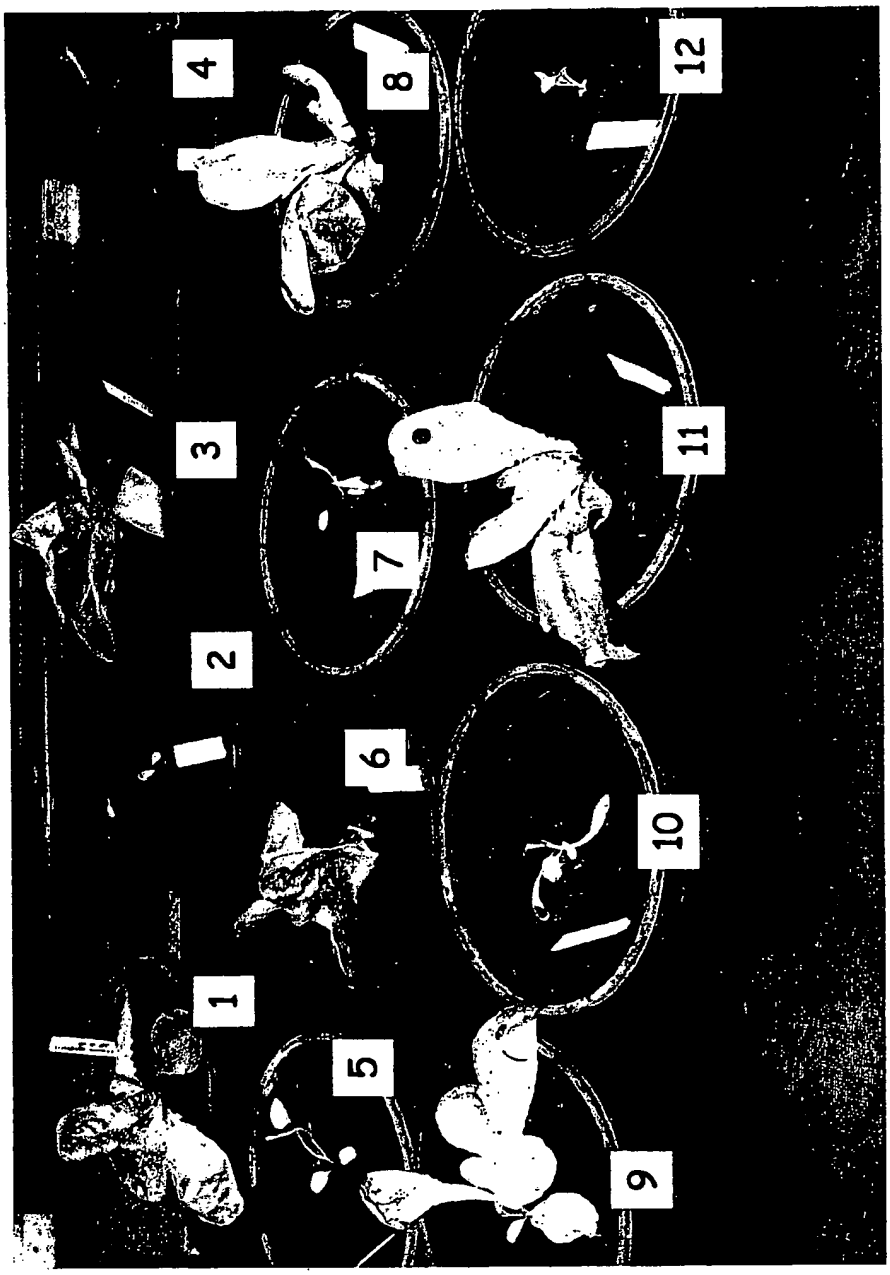


FIG. 10

Grupo de controle

Progênie derivada do mutante de descoloração reduzida de alface

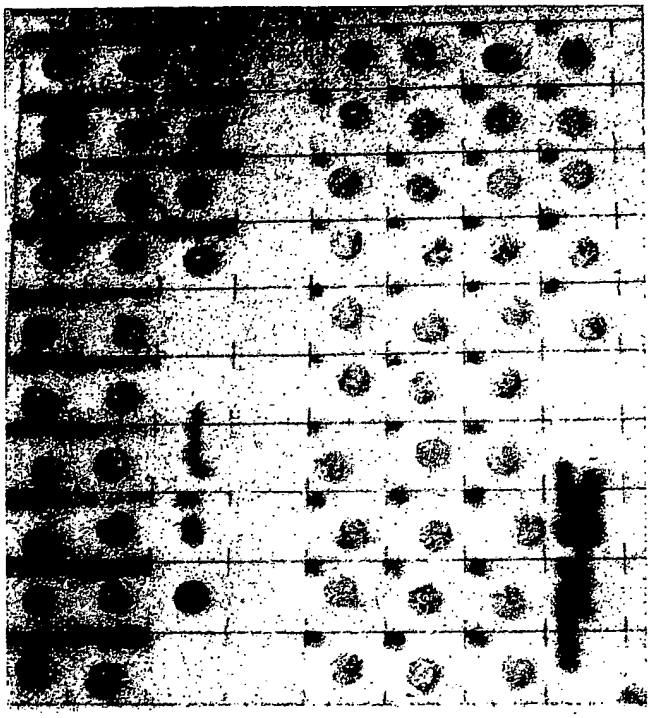


FIG. 11

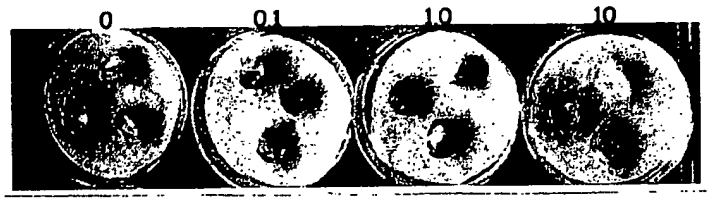


FIG. 12

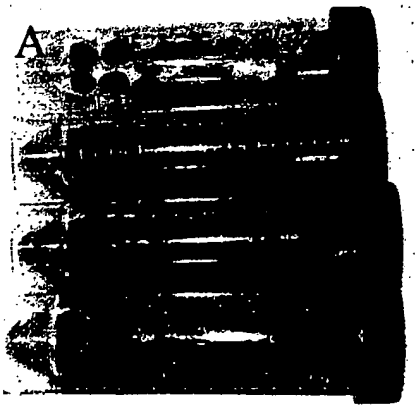


FIG. 13A

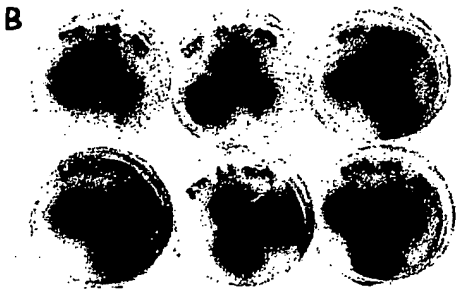


FIG. 13B

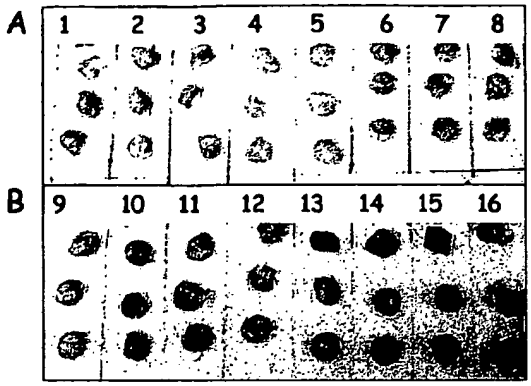

A
1
2
3
4
5
6
7
8
B
9
10
11
12
13
14
15
16

FIG. 14


Planta de controle
Mutante de descoloração reduzida

FIG. 15

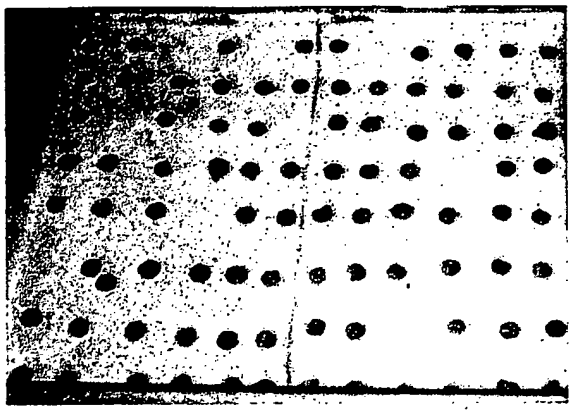


FIG. 16



FIG. 17



FIG. 18

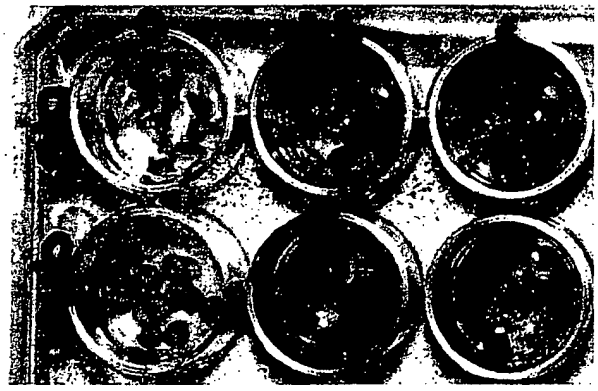


FIG. 19



FIG. 20

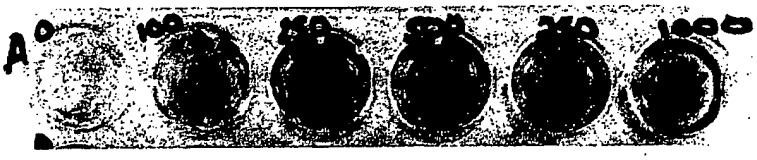


FIG. 21