



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

(21) **PI0706430-6 A2**



* B R P I 0 7 0 6 4 3 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 08/01/2007
(43) Data da Publicação: 29/03/2011
(RPI 2099)

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

(54) Título: **MÉTODO PARA TRIAR UMA POPULAÇÃO DE PLANTAS OU PARTE DE PLANTAS QUANTO À PRESENÇA NAS MESMAS DE INDIVÍDUOS, PLANTA, PROGÊNIE DE UMA PLANTA, PARTE DE UMA PLANTA, SEMENTE DE UMA PLANTA, PRODUTO DE HORTALIÇA, FRUTO, E, FLOR**

(57) **Resumo:** METODO PARA TRIAR UMA POPULAÇÃO DE PLANTAS OU PARTES DE PLANTAS QUANTO À PRESENÇA NAS MESMAS DE INDIVÍDUOS, PLANTA, PROGÊNIE DE UMA PLANTA, PARTE DE UMA PLANTA, SEMENTE DE UMA PLANTA, PROGÊNIE DE UMA SEMENTE, PRODUTO DE HORTALIÇA, FRUTO, E, FLOR A presente invenção refere-se a um método para triar uma população de plantas ou partes de plantas pela presença nas mesmas de indivíduos que apresentam uma descoloração superficial induzida por ferimento reduzida em comparação a uma planta ou parte de planta de controle, cujo método compreende prover uma população de plantas ou partes de plantas a serem triadas e sobre as plantas ou partes de plantas de controle; criar uma superfície do ferimento sobre as plantas ou partes de plantas a serem triadas e sobre as plantas ou partes de plantas de controle; incubar as superfícies do ferimento criadas para permitir que ocorra descoloração nas, ou, sobre as plantas ou partes de plantas de controle; observar a descoloração da superfície do ferimento na, ou, sobre as plantas ou partes de plantas; comparar a descoloração da superfície do ferimento na, ou, sobre as plantas ou partes de plantas a serem triadas com a descoloração observada sobre, ou na planta ou parte de planta de controle. A invenção refere-se ainda a plantas assim selecionadas.

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

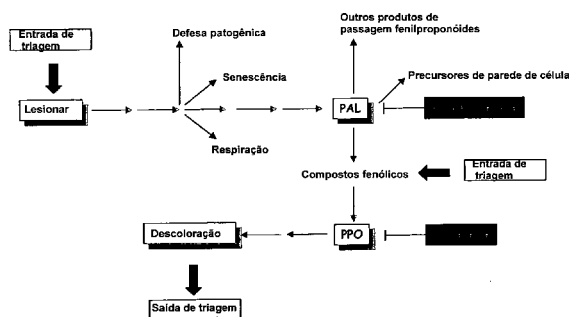
(73) Titular(es): Rijk Zwaan Zaadteelt En Zaadhandel B.V.

(72) Inventor(es): Cornelis Maria Petrus Van Dun

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007000226 de 08/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/077229 de 12/07/2007



“MÉTODO PARA TRIAR UMA POPULAÇÃO DE PLANTAS OU PARTES DE PLANTAS QUANTO À PRESENÇA NAS MESMAS DE INDIVÍDUOS, PLANTA, PROGÊNIE DE UMA PLANTA, PARTE DE UMA PLANTA, SEMENTE DE UMA PLANTA, PROGÊNIE DE UMA SEMENTE, PRODUTO DE HORTALIÇA, FRUTO, E, FLOR”

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 lesão em comparação a uma planta de controle. A invenção refere-se igualmente a plantas e partes de plantas derivadas delas apresentando descoloração superficial ausente ou reduzida, induzida por lesão, obtida por meio deste método e para partes e progênie destas.

Fundamento da invenção

Devido à demanda crescente, o processamento de produto fresco, em particular alface, expandiu-se significativamente nos anos recentes. A colheita e o processamento da alface envolvem o corte extensivo das folhas, o que induz uma forte resposta às lesões. Esta resposta à lesão 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 lesionada, respiração e dessecação devido à transpiração. Especialmente o acastanhamento ou rosado enzimático é considerado de importância significativa, determinando direta ou indiretamente a qualidade global da alface recém-colhida, embalada.

Além disto, como uma consequência 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.

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

5 Entre estes estão o acondicionamento da alface recém-colhida, 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
10 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 isolamento física e que protegem eficazmente o produto
15 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
20 segundos a 45°C, imediatamente depois do processamento. Possivelmente, o choque termal desvia a biossíntese 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
25 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.

5 Independentemente da tecnologia aplicada, a melhoria da qualidade pós-colheita da alface processada, 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

10 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 lesão para prover plantas e progênie delas derivadas que sejam resistentes às lesões do processamento pós-colheita, tais como, o acastanhamento ou rosado enzimático. É um objetivo adicional da invenção prover plantas que apresentem uma descoloração rosada ou acastanhada significativamente reduzida por lesão. Descoloração por lesão pode igualmente ser visível em partes de plantas, tais como caules, sementes, frutas, folhas, flores, tubérculos, brotos. É, assim, um objetivo adicional da invenção prover um método de triagem para selecionar plantas, que apresentam uma resposta reduzida à descoloração induzida por lesão 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 superficial reduzida induzida por lesão em comparação a uma planta ou parte de planta de controle, o método compreendendo:

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

b) opcionalmente, criar uma superfície lesionada sobre as plantas ou partes de planta a serem triadas e nas plantas ou partes de planta de controle;

5 c) incubar as superfícies lesionadas para permitir que ocorra descoloração nas, ou, sobre as mesmas;

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

10 e) comparar a descoloração superficial de lesão observada na, ou sobre as plantas ou partes de plantas com aquela observada sobre, ou na planta ou parte de planta de controle para identificar plantas ou partes de plantas que não apresentam descoloração ou descoloração que é 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, *inter alia*, apropriado para hortaliças com folhas, tais como alface, 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, pêsego, pêra, damasco, 20 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 lesão em uma ou mais de suas partes ou tecidos. Para a triagem, é conseqüentemente muito 25 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, pode ser apropriadamente usada em fatias de banana da fruta descascada e, fatias de caule de flores, são um veículo de teste muito prático.

Em um modo de realização específico o método é em

particular útil para selecionar as plantas que pertencem à família *Asteraceae*, em particular plantas do gênero *Lactuca* e mais em particular às espécies *Lactuca sativa* ou às plantas que pertencem ao gênero *Cichorium* e em particular às espécies *Cichorium intybus* e *Cichorium endívia* que apresentam
5 uma ausência ou redução de descoloração superficial induzida por lesão.

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
10 induzida por lesão 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 plasma germinativo, que são coleções de plantas apresentando variação natural. Além disto, uma
15 população de plantas transgênicas pode ser usada.

O método da invenção é executado apropriadamente com partes de planta que têm uma superfície lesionada. 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
20 venadas pode ser usado. Apropriadamente, os discos são cortados destas nervuras.

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 da
25 descoloração é então muito bem visível em torno das bordas da lesão sobre o papel. No caso de plantas do gênero *Lactuca* e *Cichorium* a descoloração é a resposta rosada.

Alternativamente, o ambiente aquoso compreende água ou uma solução. Em um modo de realização específico que será ilustrado mais

abaixo a solução contém L-3,4-dihidroxifenilalanina. Este composto é convertido para a produção do pigmento preto melanina pela oxidase da enzima de polifenol. Os compostos da alternativa que podem ser usados em relação a isto incluem, mas não estão limitados ao ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, L-tirosina e catecol.

A invenção refere-se, além disto, a uma planta apresentando uma descoloração superficial induzida por lesão reduzida, planta esta obtível submetendo-se uma população de plantas ao método de triagem da invenção e selecionando-se plantas da população que não apresentam descoloração superficial na triagem ou apresentam uma descoloração superficial na triagem que é reduzida em comparação a uma planta de controle.

Apropriadamente a planta é uma hortaliça com folhas, mais em particular uma planta que pertence ao gênero *Lactuca* e, em particular, à espécie *Lactuca sativa* ou uma planta que pertence ao gênero *Cichorium* e, em particular, às espécies *Cichorium intybus* e *Cichorium endivia*.

Preferivelmente a planta da invenção é identificada na triagem e subseqüentemente selecionada como tendo descoloração superficial induzida por lesão reduzida ou ausente, mas, subseqüentemente, é testada para determinar se tem modo de vida normal. Mais em particular, a planta, preferivelmente, não deveria apresentar efeitos pleiotrópicos negativos.

De acordo com a invenção foram identificadas e selecionadas plantas que não apresentaram, ou que apresentaram uma descoloração superficial induzida por lesão significativamente reduzida. A progênie de sementes destas plantas foram depositadas com o NCIMB e receberam um número de acesso como listado na **Tabela 1**. Detalhes sobre a descendência das sementes dos depósitos estão dados no Exemplo 4 e no Exemplo 6. Estes depósitos são criados por que têm a característica específica única da descoloração induzida por lesão significativamente reduzida, ou não. Eles não

foram testados pelos critérios DUS para registro de variedade, isto é, capacidade distintiva, uniformidade e estabilidade em todas as características de registro, e não é esperado que, de qualquer maneira, satisfaçam estes critérios

Tabela 1

Planta nº	Referência interna (= referência NCIMB)	Número de acesso NCIMB	Data do depósito
06D.210202	06D.863B2	41454	3 jan. 2007
05D.202539	07G.9979	41441	10 out. 2006

5 Além disto, a invenção refere-se a plantas tendo uma descoloração superficial induzida por lesão reduzida ou ausente e que são obteníveis cruzando-se uma planta da invenção com outra planta da mesma espécie. A característica “descoloração superficial induzida por lesão reduzida ou ausente” pode, então, ser levada a outras plantas que não tenham,
10 originalmente, a característica. Se as plantas resultantes deste cruzamento são realmente plantas da invenção pode ser testado submetendo-se estas plantas ao método de triagem da invenção. Preferivelmente, as plantas que são selecionadas da invenção são igualmente testadas para se têm modo de vida normal.

15 A invenção refere-se, além disto, à progênie de uma planta originária da invenção que retém a ausência ou redução da descoloração da folha induzida por lesão como encontrada na planta originária. Esta progênie pode ser qualquer uma das gerações retiradas da originária. Enquanto a característica “descoloração superficial induzida por lesão reduzida ou
20 ausente” for mantida a planta é uma planta da invenção.

A invenção refere-se adicionalmente a partes de plantas da invenção. Partes de plantas como cabeças ou folhas da alface ou endívia são normalmente as partes que têm uma superfície de corte que pode estar sujeita à descoloração.

25 Partes de planta da invenção podem ser usadas na cultura de tecidos para regenerar plantas que retêm a ausência ou redução da descoloração da folha induzida por lesão como encontrada na planta da qual o

tecido para a cultura de tecido é derivado. Estas plantas regeneradas também são parte desta invenção.

5 A invenção refere-se, além disto, à semente de uma planta da invenção. A partir da semente podem ser cultivadas plantas que também têm a característica “descoloração superficial induzida por lesão reduzida ou ausente”. Se, ou não, as sementes e, por conseguinte, as plantas cultivadas das mesmas retiveram esta característica pode ser testado no método de triagem da invenção. A invenção também se refere a geração adicional de sementes que retêm a ausência ou redução de descoloração de folha induzida por lesão
10 como encontrada nas sementes originais.

A invenção é comercialmente muito interessante para o mercado da hortaliça processada. 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. A característica
15 “descoloração superficial induzida por lesão reduzida ou ausente” da invenção é, portanto, encontrada de maneira adequada em produtos vegetais processados, como alface, endívia ou chicória-endívia cortadas, ou combinações destes. Quando triadas usando-se o método da invenção, hortaliças processadas da invenção não apresentam, ou apresentam uma
20 descoloração de folha induzida por lesão limitada. Todas as hortaliças processadas, em particular alface, endívia e chicória-endívia que satisfazem a triagem são parte da invenção uma vez que foi demonstrado que elas têm uma modificação levando a um fluxo metabólico dependente de PAL e/ou PPO reduzido.

25 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 lesionada. O rosado pode

igualmente ser observado em locais distantes da superfície lesionada na nervura central da folha assim como na extremidade. Às vezes o rosado pode ser igualmente observado em estágios logo antes da colheita que é considerado ser devido ao dano abiótico ou sobrematuridade da safra.

5 As diferentes formas de descoloração são afetadas pela atividade enzimática, que é fortemente realçada como uma consequência da lesão e que gera diversas formas de polifenóis e produtos de reação derivados dos mesmos.

10 Uma atividade enzimática importante envolvida na reação de acastanhamento é PPO. Atividade de PPO com relação ao acastanhamento enzimático não está restrita 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
15 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
20 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
25 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. Na alface, derivados do ácido cafeico como ácido clorogênico e

isoclorogênico atuam, principalmente, como substrato da PPO.

O nível da enzima PPO não é especificamente induzido pela lesão dos tecidos da planta e reside, inertemente no cloroplasto. Com a lesão 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 pela lesão. Conseqüentemente, o potencial de acastanhamento do tecido da alface parece não estar limitado ao aumento da PPO no tecido da folha, mas, na verdade, pela taxa de biossíntese de polifenol pela lesão.

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 a lesão, enquanto que, na alface, a reação de acastanhamento pode levar alguns dias devido ao fato de que, na alface, a associação de polifenóis exige muito ser sintetizada de novo com a lesão.

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, a lesão 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 pela lesão 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 lesão. 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; 5 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.

10 É, além disto, evidente que a lesão é percebida 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 da lesão e para a defesa contra micróbios patógenos. Conseqüentemente, é provável que muitos 15 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 lesão.

A maioria destes fatores genéticos é atualmente desconhecida 20 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 da lesão da planta.

Por exemplo, embora a atividade da PAL induzida por lesão 25 seja considerada para determinar o nível de acastanhamento da alface, sabe-se que produtos do caminho fenil propanóide estão envolvidos *inter alia* na biossíntese ou, também, na resposta de defesa. Conseqüentemente reduzindo-se a atividade da PAL induzida por lesão a fim de reduzir o potencial de acastanhamento pode comprometer outras funções além do acastanhamento

induzido por lesão 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 seleção é baseada em uma resposta à descoloração induzida por lesão da planta, em particular uma hortaliça com folhas, mais em particular alface, endívia ou chicória-endívia, que é canalizada através da PAL e/ou da PPO.

3. Caracterização dos mutantes modificados por sua resposta à lesão 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, em particular uma hortaliça com folhas, mais em particular alface, endívia ou chicória-endívia, de acordo com a prática comum.

A invenção refere-se assim a um método de triagem imparcial para identificar, selecionar e obter uma planta apresentando uma descoloração induzida por lesão e lesões de processamento pós-colheita tais como o acastanhamento ou rosado enzimático reduzidas

A invenção, em outro modo de realização, refere-se a um método imparcial que usa um substrato que é convertido em um pigmento

pela PPO. Nesta análise, a triagem é especificamente para mutantes da PPO. Um substrato apropriado é a L-DOPA que é convertida no pigmento preto melanina.

5 A invenção está ilustrada aqui em referência a hortaliças com folhas, como alface, mas também pode ser praticada, da mesma maneira, com outras plantas conforme indicado acima.

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

- 10 a) tratar sementes M0 de uma espécie de planta a ser modificada com um agente mutagênico para obter sementes M1;
- b) cultivar plantas das sementes M1 assim obtidas para obter plantas M1;
- c) opcionalmente repetir as etapas b) e c) n vezes para obter M1+ n sementes;
- 15 d) germinar as M1+n sementes assim obtidas e cultivar as plantas destas sementes.

De acordo com a invenção estas plantas são subseqüentemente analisadas para suas respostas à descoloração induzida por lesão. Plantas que não apresentam, ou apresentam uma resposta reduzida à descoloração pela lesão são selecionadas. Deste modo, a progênie das plantas selecionadas é cultivada e a resposta da descoloração induzida por lesão é medida.

20

A fim de criar 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 como a alface. Por exemplo, alguém pode tratar sementes da alface 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

25

para pares-base AT a uma frequência, 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 ems são chamadas tipicamente de sementes M1. Como uma consequência 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 transferidas para a geração seguinte, que é chamada M2. Mutações ou combinações destas que são haplo-insuficientes, deste modo, provocando esterilidade ou que induzam à mortalidade do embrião não serão 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 da lesão 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.

5 Preferivelmente, a invenção refere-se a alelos piramidais provocando resposta reduzida à descoloração induzida por lesão.

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

10 A invenção refere-se, além disto, a obtenção de plantas ou partes de plantas com genótipos alterados, plantas estas, ou partes de plantas que apresentam uma susceptibilidade reduzida às lesões fisiológicas de processamento pós-colheita, tal como acastanhamento ou rosado enzimático. A invenção refere-se a plantas ou partes de plantas que têm em seus genomas informações genéticas que são responsáveis pela susceptibilidade reduzida às lesões de processamento pós-colheita tal como acastanhamento ou rosado enzimático e é encontrada no genoma de uma planta de alface.

15 As progênes das plantas como reivindicadas são também parte desta invenção. “Progênie” como usada aqui pretende englobar todas as plantas tendo a mesma, ou uma similar, susceptibilidade reduzida às lesões de processamento pós-colheita, em particular, acastanhamento ou rosado enzimático, que as plantas originais descritas aqui e sendo derivadas delas por qualquer maneira, tal como reprodução sexual, como autofertilização ou fertilização cruzada com outra planta do mesmo gênero, ou reprodução vegetativa como corte, cultura de tecido, cultura haplóide, cultura de protoplasta, fusão de protoplasta, ou outras técnicas. Esta progênie não é apenas a primeira geração de plantas derivadas por uma ou mais destas técnicas, mas, também, qualquer geração posterior de plantas derivadas de uma ou mais destas técnicas provido que as plantas derivadas tenham susceptibilidade reduzida.

A fim realizar a triagem fenotípica da invenção, uma

superfície lesionada deve ser gerada uma vez que a reação de descoloração enzimática é induzida pela lesão. Lesão é um distúrbio irreversível da planta natural, tecido e/ou estrutura celular por métodos como cortar, perfurar, fatiar, abradar, espremer, quebrar, descascar, esmagar, pressionar, reduzir, moer, 5 injeção fluida, choque osmótico, remover, segar, rasgar.

Subseqüentemente, uma característica fenotípica que seja diagnóstica para o caminho que leva à descoloração do tecido e que possa ser usada muito eficientemente em uma triagem da população mutante deve se tornar evidente.

10 Descobriu-se, surpreendentemente, que estas características fenotípicas poderiam ser obtidas coletando-se partes de plantas e incubando-as sob condições muito específicas que favoreceriam a ocorrência de formas diferentes de descoloração da superfície lesionada. Subseqüentemente, estas análises puderam ser aplicadas a um grande número de plantas mutantes, de 15 modo a selecionar aquelas plantas que apresentassem uma redução à resposta da descoloração induzida por lesão.

Um modo de realização desta invenção está baseado na descoberta surpreendente de que quando discos de folhas, em particular folhas da alface, são coletados e incubados entre papéis de filtro umedecidos a 5°C, 20 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. n.º. 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 25 atingida. A formação da pigmentação rosada ocorre especificamente nas superfícies lesionadas.

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 alface (*L. sativa*). No presente exemplo 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, seguido da contagem por posição do disco de folha do número de pixéis com uma cor rosada 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 do que o padrão, como a variedade cultivada ‘Troubadour’. 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 de mutantes individuais 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 múltiplo de Dunnett com um padrão (Dunnett CW, J. Amer. Statist. Assoc. 50:1096 - 1121 (1955)).

Além disto, mostrou-se que a resposta à descoloração induzida por lesão pode ser obtida usando-se muitos tipos diferentes de tecido de folhas de diferentes estágios de desenvolvimento. Por exemplo, o tecido da nervura central pode igualmente ser induzido para dar esta resposta pela lesão. Quando aplicada aos diferentes tipos de alfices, tais como, 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.

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 biossíntese 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 subsequente 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 à resposta do 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.

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

10 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 rosado natural, que pode algumas vezes ser visto em plantas cultivadas sob condições de campo.

15 Um modo de realização adicional desta invenção é baseado 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 lesionada torna-se castanha após aproximadamente 4 dias. Especialmente na superfície lesionada da nervura principal o acastanhamento pode claramente ser observado. Além disso, a reação de acastanhamento pode igualmente ser observada por toda a planta, sobre folhas danificadas pelo corte ou pela abrasão.

20 Todas estas reações de acastanhamento podem ser completamente inibidas pela L-cisteína, um inibidor da PPO, o 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.

25 Estas reações de acastanhamento induzidas por lesão 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 lesão reduzido.

Um modo de realização adicional desta invenção é baseado na descoloração em superfícies lesionadas de tecidos da alface induzida 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 lesionada que é a manifestação da formação de melanina via 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 considerado 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 lesão 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.

Tomadas em conjunto, a formação de pigmentações diferentes nas superfícies lesionadas geradas nas plantas, monitora modificações em um caminho que começa pela indução de um sinal de lesão, canalizado através da PAL e da PPO e levando à descoloração. Como descritas, estas reações de descoloração induzida por lesão podem prontamente ser avaliadas por inspeção visual 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 lesão de discos de folha *in vitro* justapõe-se amplamente com a descoloração induzida por lesão 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, lesão e uma das conversões metabólicas finais mediadas pela PPO, o procedimento

5 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.

10 Plantas mutantes, que foram identificadas como tendo sido modificadas no que diz respeito ao processo fisiológico levando de uma descoloração por lesão a uma dependente da PAL e da PPO baseada em uma ou mais das análises fenotípicas descritas acima podem ser adicionalmente

15 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.

20 No caso das mutações recessivas estas duas possibilidades podem ser facilmente distinguidas pela execução de testes de alelismo, que compreendem 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, caso do fenótipo nos

25 mutantes é determinada por lócus recessivo diferente o que não seria o caso.

Uma vez que mutagênese aleatória foi 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.

5 Este procedimento é adicionalmente relevante para determinar se mutações em locos específicos envolvidos em descoloração induzida por lesão 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 à lesão. 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.

15 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.

25 Embora mutagênese induzida seja o método preferido para ser usado nesta 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 lesão, obviamente, a estrutura primária dos genes relevantes deveria ser conhecida.

Uma parte adicional desta invenção refere-se a mutantes da alface e à progênie derivada dos mesmos que são identificadas na base da descoloração rosada induzida por lesão de discos de folha da alface. Aplicando-se estas análises de rosado às plantas de uma população M2 que contém mutações aleatórias induzidas por EMS resultou na identificação de um número de mutantes que apresentaram uma redução significativa da resposta rosada em comparação com as plantas de controle que não contêm as mutações induzidas por EMS.

A maior parte dos mutantes apresentou um fenótipo apequenado e, freqüentemente, clorótico. No entanto, surpreendentemente, descobriu-se que alguns mutantes com uma resposta rosada reduzida apresentaram um *habitus* de cultivo normal, isto é, um tamanho, forma, crescimento e cor muito semelhante aos das plantas de controle.

Quando plantas da progênie deste mutante particular cultivado de sementes obtidas via autofertilização são analisadas pelo rosado, é observada uma redução similar à encontrada para o mutante originalmente identificado. 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 são cultivadas à maturidade e testadas para acastanhamento enzimático de tecido lesionado da nervura central, esta resposta é também fortemente inibida.

5 Isto mostra que a análise do rosado do disco de folha que é parte desta invenção 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.

10 Conseqüentemente, a análise do rosado do disco de folha pode ser usada como uma ferramenta de seleção 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.
15 Por exemplo, além das populações de ems, alguém pode usar acessos naturais ou populações de cultivos.

Um ou mais dos métodos de triagem providos por esta invenção pode, ser aplicado a qualquer espécie de hortaliça com folhas para a qual a qualidade de processamento pós-colheita precisar de melhoria.
20 Conseqüentemente, esta invenção pode, além da alface cultivada ser igualmente aplicada a outras espécies de plantas, por exemplo, pertencentes às *Asteraceae*, bem como à espécie selvagem do gênero *Lactuca*. Além disto, a invenção pode ser aplicada em particular às espécies de plantas pertencentes ao gênero de planta *Cichorium* ao qual espécies como endívia (*Cichorium endívia*), chicória e chicória-endívia (*Cichorium intybus*) pertencem.
25

A presente invenção refere-se a uma característica fenotípica que pode ser detectada em uma planta executando-se um dos métodos que estão aqui apresentados. Plantas da invenção são aquelas plantas que, comparadas a uma planta de controle, apresentam ausência ou uma redução

na descoloração superficial induzida por lesão. A presença da característica é determinada por meio de um ou mais de três testes de descoloração, a saber, a ocorrência de rosado ou acastanhamento ou a capacidade de converter o substrato L-DOPA em melanina. Uma planta da invenção é uma planta em que pelo menos um destes três testes apresentou uma descoloração que é pelo menos reduzida em comparação a um controle.

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 quando incubado entre papel de filtro umedecido a 5°C por 7 dias apresenta descoloração rosada em torno das bordas do disco.

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

Figura 1: Esboço esquemático da lógica por trás do projeto do procedimento de triagem do mutante de populações de alface para descoloração enzimática reduzida pós-colheita. O sinal de entrada da triagem é a lesão 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 lesionada 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 lesionada.

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 prato mostra os % de cinamaldeído usados.

Figura 4: Efeito inibitório da L-cisteína, inibidor da 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 prato) 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 em folhas intactas na temperatura indicada em cada prato.

Figura 7: Conversão da pigmentação rosada formada pela resposta à lesão 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 à lesão 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 são 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 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 lesão. 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 lesão reduzidas severamente.

5 **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
10 superfície lesionada. 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
15 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
20 apresenta uma descoloração rosada reduzida induzida por lesão 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
25 apresentaram uma resposta normal de acastanhamento.

Figura 15: Avaliação de um mutante da alface que apresenta uma resposta reduzida de descoloração rosada induzida por lesão 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.

5 **EXEMPLOS**

EXEMPLO 1

Modificação genética da alface usando-se em

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) em durante 24 horas na temperatura ambiente. Após o tratamento do em as sementes M1 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 frequência da mutação foi estimada com base no número relativo de plantas individuais com um fenótipo descolorado que foram perturbadas na biossíntese da clorofila.

EXEMPLO 2

20 *Desenvolvimento de um diagnóstico de triagem fenotípica para a descoloração induzida por lesão da alface baseada na formação de pigmento rosado*

Uma análise fenotípica foi desenvolvida na qual a descoloração induzida por lesão 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 nesta 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 PPO, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Embora L-DOPA não seja considerado, um substrato natural para a PPO da alface, uma descoloração castanho escuro a preto foi observada na superfície lesionada 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 aplicando-se um choque termal antes de induzir a resposta à lesão. 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 a uma 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.

5 Discos de folha foram coletados e incubados de acordo com os procedimentos descritos acima. Depois que a resposta da lesão 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
10 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 que é formada pelo sistema de oxidação do polifenol da alface.

15 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 que apresentou severos sintomas de rosado ao longo das nervuras. Isto é
20 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 na temperatura ambiente, a descoloração rosada desapareceu segundo as indicações da
25 **Figura 8**.

Considerados em conjunto, estes dados experimentais mostram que discos de folha da alface podem ser induzidos por lesão 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 lesão modificada canalizada via PAL, PPO ou ambos.

EXEMPLO 3

Triagem para mutantes com descoloração reduzida induzida por lesão

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

10 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
15 disco de folha dependendo da intensidade da descoloração rosada. Com base nesta avaliação, as plantas foram selecionadas daquelas cujos discos de folha ou não apresentaram, ou apresentaram um grau relativamente baixo de descoloração da superfície lesionada. A planta com traços mal visíveis de descoloração foi numerada como 06D.210202.

20 Das 12000 plantas, 1 planta foi finalmente selecionada, a que apresentou apenas traços de descoloração dificilmente visíveis e 11 que apresentaram um nível relativamente baixo de descoloração. O resultado de uma destas análises é mostrado na **Figura 9**.

25 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 lesão

A fim de identificar mutantes da alface com baixo potencial de acastanhamento enzimático induzido por lesão 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 escore visual para cada disco de folha dependendo da intensidade da descoloração rosada. Com base nesta avaliação, as plantas foram selecionadas daquelas cujos discos de folha ou não apresentaram, ou apresentaram um grau relativamente baixo de descoloração da superfície lesionada. Das 8500 plantas 8 plantas que não apresentaram nenhuma descoloração visível foram selecionadas 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 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).

25 **EXEMPLO 5**

Análise fenotípica de mutantes selecionados apresentando, descoloração reduzida induzida por lesão

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 alfaca 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 fenotípica para a descoloração induzida por lesão da alface baseada na formação do pigmento acastanhado

5 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 lesionada tornou-se acastanhada. Na presença de L-cisteína 10 mM a resposta de acastanhamento foi inibida
10 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
15 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 lesão da alface baseada na conversão de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) em um pigmento preto chamado melanina
20

Além das análises que tratam a descoloração induzida por lesão 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
25 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 lesionada 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**).

5 Conseqüentemente, esta análise permite a identificação de mutantes que são modificados pela capacidade de criar uma atividade da PPO em uma superfície lesionada 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**.

10 **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

15 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 lesionadas de discos de folha significativamente reduzida é, também, efetivamente reduzida na resposta de acastanhamento induzida por lesão, uma progênie de várias plantas foi cultivada à maturidade.

20 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
25 rosada induzida por lesão foram, também, fortemente reduzidas no acastanhamento da nervura central induzido por lesão. 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 lesionadas 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 lesão foram, também, fortemente reduzidas no acastanhamento da nervura central induzido por lesão quando processadas e armazenadas em sacos de plástico usando-se atmosfera ambiente. O resultado desta experiência está mostrado na **figura 15**.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para triar uma população de plantas ou partes de plantas quanto à presença nas mesmas de indivíduos apresentando uma descoloração superficial induzida por ferimento 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 do ferimento sobre as plantas ou partes de planta a ser triada e sobre as plantas ou partes de planta de controle;
- c) incubar as superfícies do ferimento para permitir que ocorra descoloração nas, ou, sobre as mesmas;
- d) observar a descoloração da superfície do ferimento na, ou, sobre as plantas ou partes de plantas;
- e) comparar a descoloração da superfície do ferimento observada com aquela observada na, ou, sobre as plantas ou partes de plantas a serem triadas com a descoloração que é observada sobre, ou na planta ou parte de planta de controle para identificar plantas ou partes de plantas que não apresentam descoloração ou uma descoloração reduzida em comparação com a planta ou parte de planta de controle.

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

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

4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato das plantas serem plantas frutíferas selecionadas dentre macieira, bananeira, abacateiro, pessegueiro, pereira, damasqueiro e mangueira.

5. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo

fato das plantas serem plantas selecionadas dentre gérbera e crisântemo.

6. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato das plantas pertencerem à família de *Asteraceae*, em particular ao gênero *Lactuca*, mais em particular à espécie *Lactuca sativa*.

5 7. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato das plantas pertencerem ao gênero *Cichorium* e, em particular, às espécies *Cichorium intybus* e *Cichorium endivia*.

10 8. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, 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.

9. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato das partes de plantas serem discos de folha.

15 10. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato das partes de plantas serem discos de tecido de nervura central.

20 11. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato da população de plantas ser uma população de plantas mutantes, uma coleção de germoplasma, uma população de plantas transgênicas ou uma suspensão de célula mutada.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato da população de plantas mutantes ser obtida por um tratamento de mutagênese usando produtos químicos e/ou irradiação.

25 13. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato da incubação ocorrer em um ambiente aquoso.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato do ambiente aquoso compreender papel de filtro umedecido.

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

16. Método de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato do ambiente aquoso conter um composto selecionado de L-3-4-dihidroxifenilalanina, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, L-tirosina e catecol.

5 17. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 16, 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.

10 18. Planta que apresenta uma descoloração superficial induzida por ferimento reduzida, caracterizada pelo fato da planta poder ser obtida pela sujeição de uma população de plantas a um método de triagem como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, e selecionar plantas da população que não apresentem descoloração superficial na triagem ou apresentem uma descoloração superficial na triagem que seja reduzida em
15 comparação a uma planta de controle.

19. Planta de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato da planta ser uma planta hortaliça, planta frutífera ou planta florescente.

20 20. Planta de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato da planta ser uma planta hortaliça selecionada dentre alface, endívia, escarola, batata, batata doce, aspargo, cogumelos, alcachofra e berinjela.

21. Planta de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato da planta ser uma planta frutífera selecionada dentre macieira, bananeira, abacateiro, pessegueiro, pereira, damasqueiro e mangueira.

25 22. Planta de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato pelo fato da planta ser uma planta florescente selecionada dentre gérbera e crisântemo.

23. Planta de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de pertencer à família de *Asteraceae*, em particular ao gênero

Lactuca, mais em particular às espécies *Lactuca sativa*.

24. Planta de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de pertencer ao gênero *Cichorium* e, em particular, às espécies *Cichorium intybus* e *Cichorium endivia*.

5 25. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 24, caracterizada pelo fato da planta apresentar uma descoloração da folha induzida por ferimento reduzida e nenhum efeito pleiotrópico negativo.

10 26. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20 e 23, caracterizada pelo fato da planta ser um pé de alface cuja semente foi depositada com o NCIMB na data e sob o número de acesso listado na Tabela 1.

15 27. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 25, caracterizada pelo fato da planta poder ser obtida pelo cruzamento de uma planta como definida na reivindicação 26 com outra planta da mesma espécie.

28. Progenie de uma planta originária como definida em qualquer uma das reivindicações 18 a 27, caracterizada pelo fato de apresentar a ausência ou redução de descoloração de folha induzida por ferimento como encontrada na planta originária.

20 29. Parte de uma planta, caracterizada pelo fato de ser como definida em qualquer uma das reivindicações 18 a 28.

30. Parte de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato da parte ser selecionada dentre folha, cabeça, caule, broto, raiz, tubérculo, fruto, flor, semente ou pedaços dos mesmos, e células.

25 31. Parte de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizada pelo fato da parte poder ser obtida pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

32. Planta regenerada de uma parte de planta como definida na reivindicação 29, 30 ou 31, caracterizada pelo fato de apresentar a ausência ou

redução de descoloração de folha induzida por ferimento como encontrada na origem.

33. Semente de uma planta, caracterizada pelo fato de ser como definida em qualquer uma das reivindicações 18 a 28 e 32.

5 34. Progênie de uma semente como definida na reivindicação 33, caracterizada pelo fato de apresentar a ausência ou redução de descoloração de folha induzida por ferimento como encontrada na origem.

10 35. Produto de hortaliça, caracterizado pelo fato de compreender uma planta de hortaliça ou sua parte como definida em qualquer uma das reivindicações 18 a 20, 23 a 34.

36. Produto de hortaliça de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato da hortaliça ser uma hortaliça folhosa.

15 37. Produto de hortaliça de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato da hortaliça ser selecionada dentre alface, endívia e chicória.

38. Produto de hortaliça de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato do produto ser alface processada, chicória processada, endívia processada ou suas combinações.

20 39. Fruto, caracterizado pelo fato de ser derivado de uma planta como definida em qualquer uma das reivindicações 18 a 19, 21, 28 a 34.

40. Flor, caracterizada pelo fato de ser derivada de uma planta como definida em qualquer uma das reivindicações 18 a 19, 22, 28 a 34.

25 41. Produto de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 41, caracterizado pelo fato do produto, ao ser triado pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, apresentar nenhuma ou limitada descoloração de folha induzida por ferimento.

Fig. 1

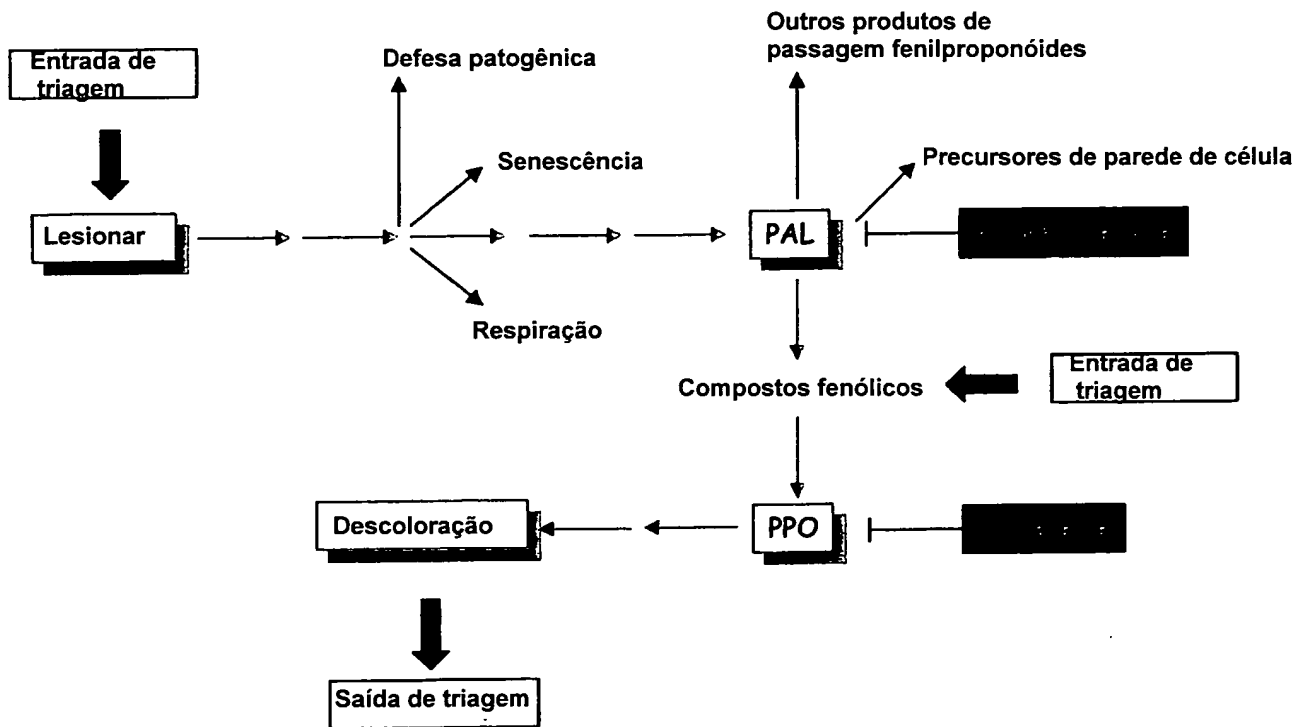


Fig.2

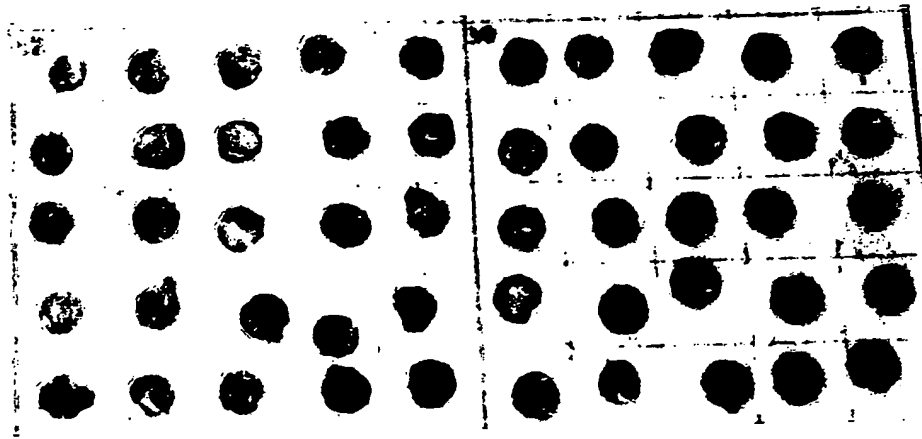


Fig. 3

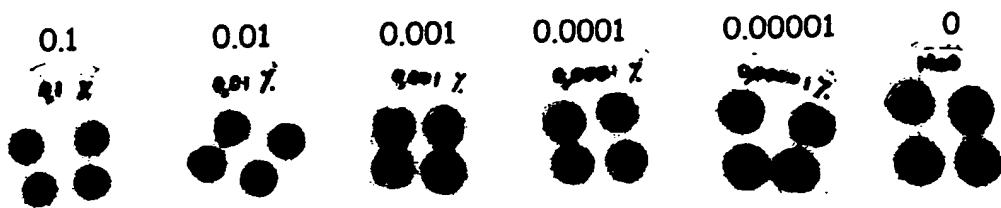


Fig. 4

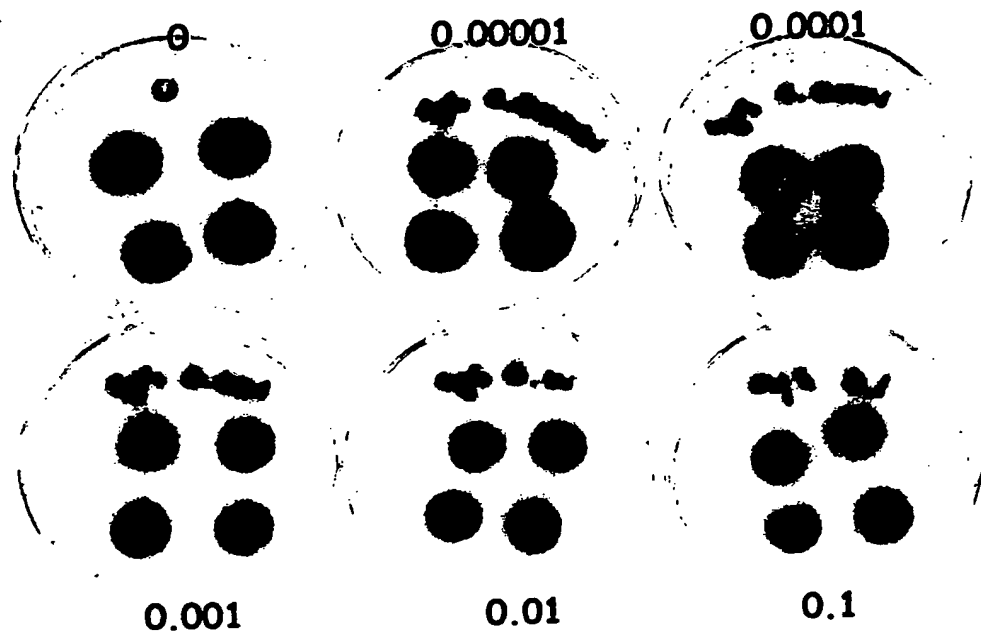


Fig. 5



Fig. 6

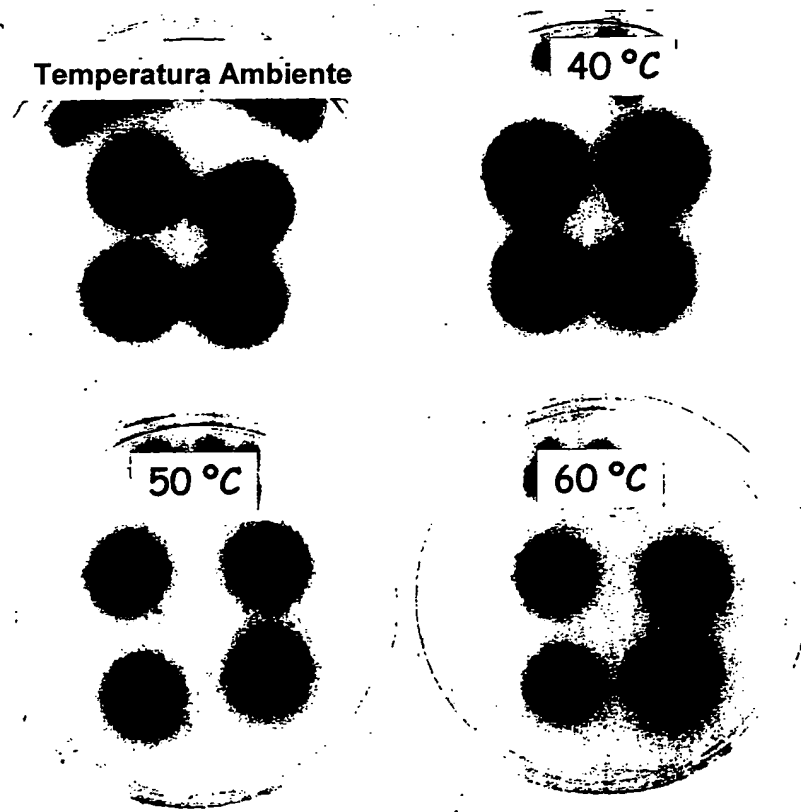


Fig. 7

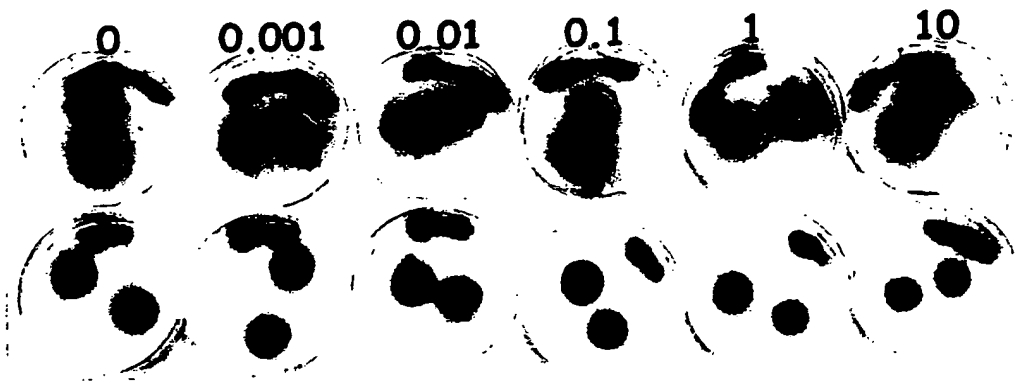


Fig. 8



Fig. 9

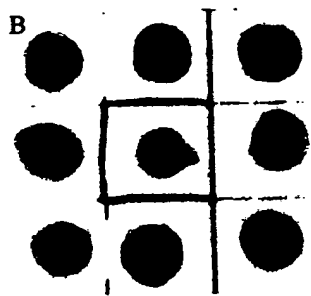
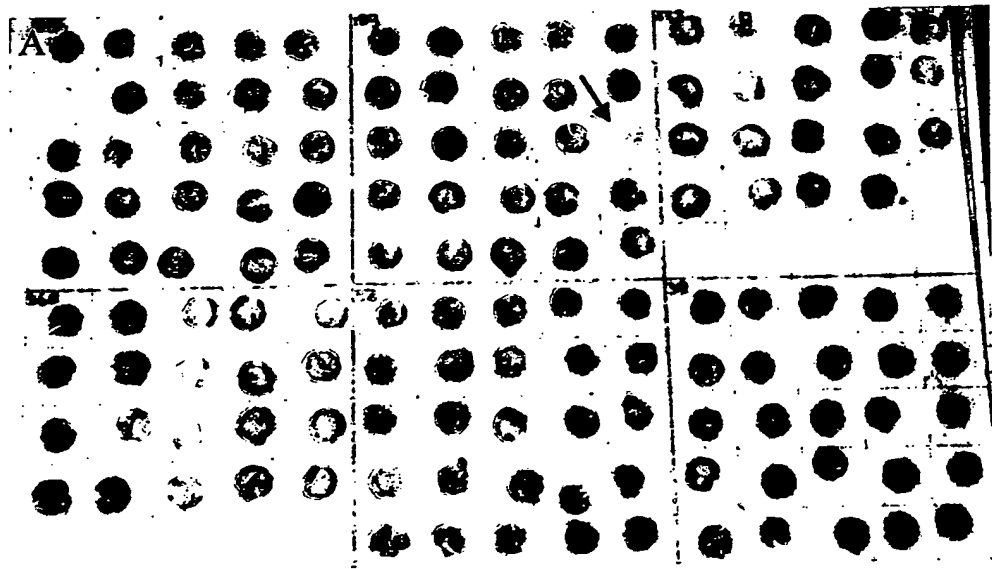


Fig. 10

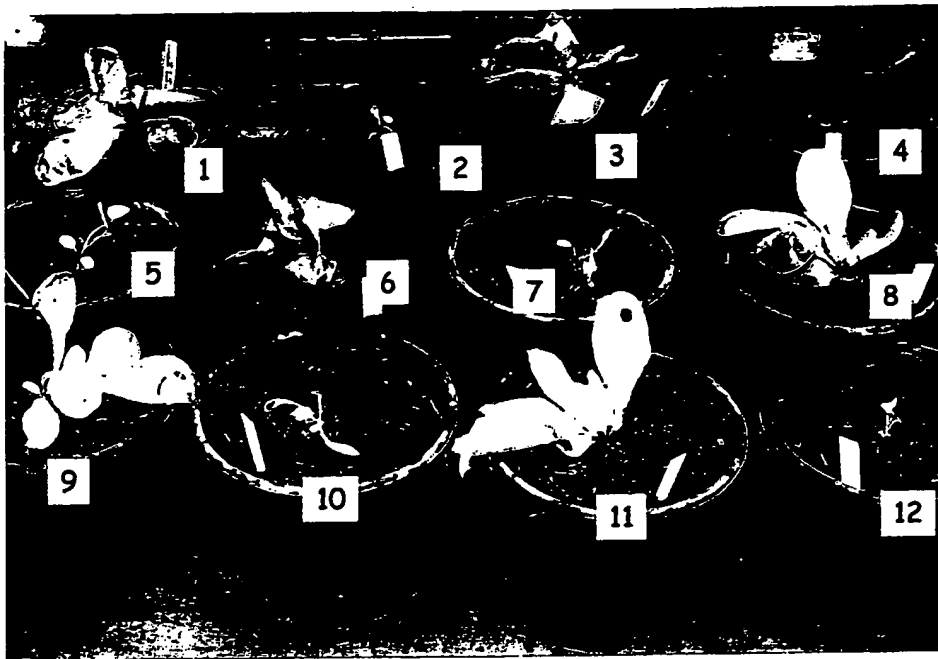


Fig. 11

Grupo de controle Progênie derivada do mutante de
descoloração reduzida de alface

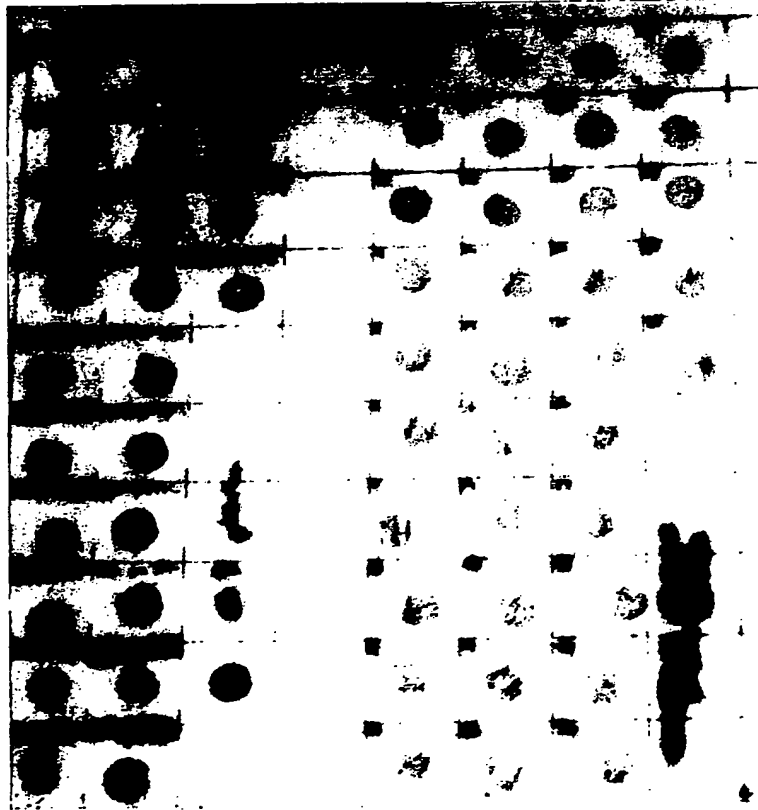


Fig. 12

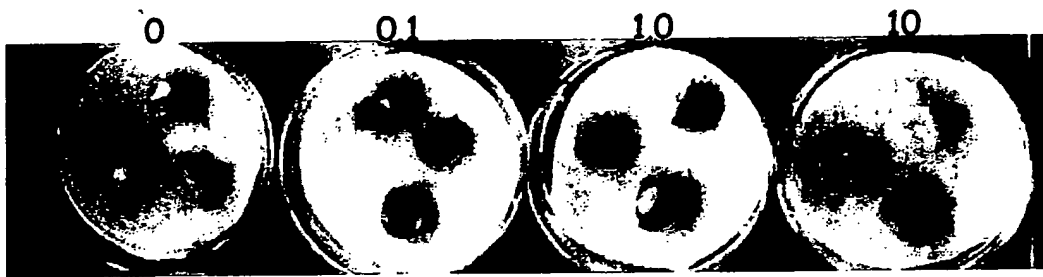


Fig. 13

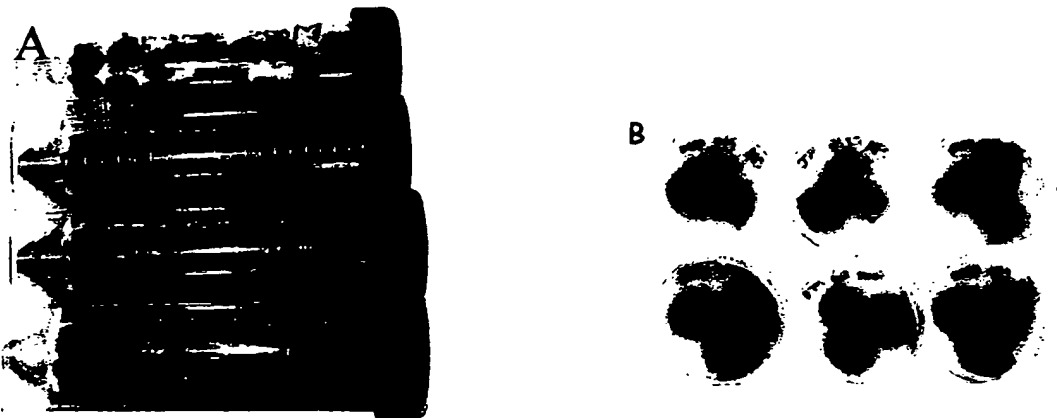


Fig. 14

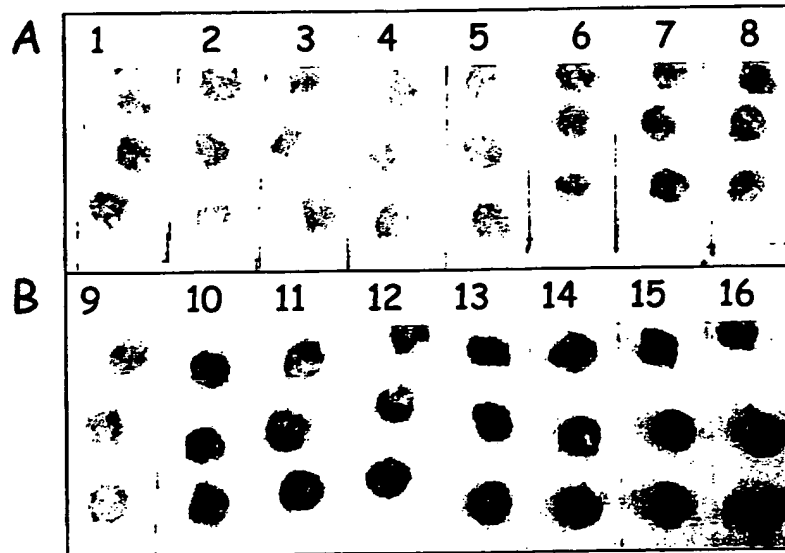
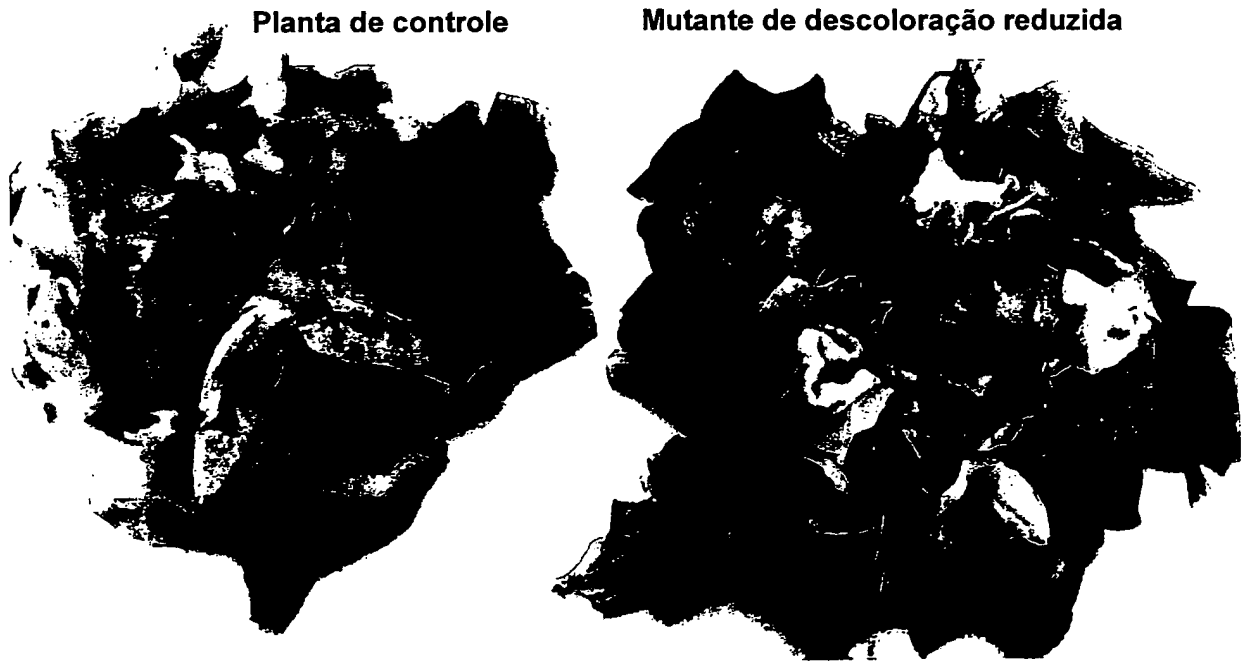


Fig. 15



RESUMO

“MÉTODO PARA TRIAR UMA POPULAÇÃO DE PLANTAS OU PARTES DE PLANTAS QUANTO À PRESENÇA NAS MESMAS DE INDIVÍDUOS, PLANTA, PROGÊNIE DE UMA PLANTA, PARTE DE
5 UMA PLANTA, SEMENTE DE UMA PLANTA, PROGÊNIE DE UMA SEMENTE, PRODUTO DE HORTALIÇA, FRUTO, E, FLOR”

A presente invenção refere-se a um método para triar uma população de plantas ou partes de plantas pela presença nas mesmas de indivíduos que apresentam uma descoloração superficial induzida por
10 ferimento reduzida em comparação a uma planta ou parte de planta de controle, cujo método compreende prover uma população de plantas ou partes de plantas da população; criar uma superfície do ferimento sobre as plantas ou partes de plantas a serem triadas e sobre as plantas ou partes de plantas de controle; incubar as superfícies do ferimento criadas para permitir que ocorra
15 descoloração nas, ou, sobre as mesmas; observar a descoloração da superfície do ferimento na, ou, sobre as plantas ou partes de plantas; comparar a descoloração da superfície do ferimento na, ou, sobre as plantas ou partes de plantas a serem triadas com a descoloração observada sobre, ou na planta ou parte de planta de controle. A invenção refere-se ainda a plantas assim
20 selecionadas.