

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 915 073**

51 Int. Cl.:

A01H 5/12 (2008.01)

A61K 36/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014** **PCT/EP2014/055012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14140209**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** **E 14710862 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2022** **EP 2966994**

54 Título: **Planta de espinaca roja**

30 Prioridad:

13.03.2013 EP 13158952

13.03.2013 US 201313798335

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2022

73 Titular/es:

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

Burgemeester Crezeelaan 40
2678 KX De Lier, NL

72 Inventor/es:

DEN BRABER, JAN HUGO

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 915 073 T3

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

DESCRIPCIÓN

Planta de espinaca roja

- 5 La presente invención se refiere a una planta de espinaca roja (*Spinacia oleracea* L.). La invención también se refiere a las semillas y la progenie de tales plantas y al material de propagación para obtener tales plantas.
- 10 La espinaca (*Spinacia oleracea* L.) es una planta con flores de la familia *Amaranthaceae* que se cultiva como una hortaliza. Las partes comestibles de la planta de espinaca son las hojas de la etapa vegetativa. Durante la etapa vegetativa, la espinaca produce una roseta de hojas. Estas hojas son arrugadas y rizadas en el caso de los tipos de
- 15 hojas de saboya, ligeramente arrugadas en el caso de los tipos de hojas semisaboya, o anchas y planas en el caso de los tipos de hojas lisas. Las hojas de una planta de espinaca generalmente se venden frescas cortadas y embolsadas, en manojos frescos, enlatadas o congeladas. El producto de espinaca dominante en el mercado es la espinaca fresca cortada y embolsada. Este producto en bolsa se vende, o bien, como espinacas tiernas que
- 20 contiene hojas jóvenes muy pequeñas, o como espinaca adolescente que contiene hojas medianas un poco más viejas. Tanto el tamaño de las hojas de las espinacas tiernas como las adolescentes son más pequeños que los tamaños de las hojas en el momento de la cosecha de las espinacas en manojos, congeladas o enlatadas. Generalmente, las hojas cosechadas de las espinacas tiernas no superan aproximadamente ocho centímetros. Estas hojas tiernas y dulces a menudo se usan en ensaladas, pero también pueden cocinarse ligeramente o al vapor.
- 25 Los estilos de vida cambian y la demanda de los restaurantes, empresas de catering e incluso del cliente en el supermercado de hortalizas de hoja coloridas y atractivas para ensaladas u otros platos sigue aumentando. Como resultado, las empresas de cultivo de hortalizas buscan variedades con color destacado, mejor sabor y una amplia variedad de texturas.
- 30 Aunque la espinaca (*Spinacia oleracea* L.) es un producto popular debido a su atractivo sabor y alto valor nutritivo, en la actualidad la espinaca no puede añadir mucho color, distintos del verde, a platos o mezclas de ensaladas. La espinaca más colorida (*Spinacia oleracea* L.) que se conoce hasta ahora tiene hojas verdes con pecíolo rojo y nervaduras principales rojas. Estas plantas tienen hojas verdes con una coloración roja de las hojas que se limita a las áreas del pecíolo y el limbo donde se localizan las nervaduras primarias, secundarias, y en algunos casos, también terciarias, mientras que las áreas del limbo entre las nervaduras son verdes. Un ejemplo de tal planta se presenta en la Figura 2D.
- 35 La Figura 1 muestra una imagen y una representación esquemática de una hoja de espinaca, que indica el pecíolo y la lámina, de la cual a menudo se indica como el limbo, con sus nervaduras primarias, secundarias y terciarias.
- Ali MD B y otros; FOOD, AGRICULTURE & ENVIRONMENT; vol. 7, núm. 3-4, 1 de julio de 2007, describe una planta de espinaca que tiene hojas verdes con nervaduras rojas.
- 40 Dada la necesidad de espinacas (*Spinacia oleracea* L.) con hojas con una coloración más roja, el objeto de la presente invención es proporcionar una planta de espinacas (*Spinacia oleracea* L.) que tenga más color rojo que las plantas de espinacas conocidas hasta ahora.
- 45 En la investigación que condujo a la presente invención, se creó una nueva planta de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) que comprende un determinante genético que conduce a que la planta tenga una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial (superior) de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como abaxial (inferior) de la hoja, comprenden un pigmento rojo.
- 50 Las plantas de espinaca de la invención son tanto atractivas como sabrosas. Además, son más saludables que las plantas que no portan el rasgo genético de la invención. El nivel de betacianina aumenta en las plantas de la invención y se ha informado que las betacianinas tienen varios beneficios para la salud. Las betacianinas exhiben una excelente actividad antioxidante. Por otra parte, se han informado efectos anticancerígenos para las betacianinas.
- 55 La presente invención, por tanto se refiere a una planta de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) que comprende un determinante genético que conduce a que la planta tenga una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, cuyo
- 60 determinante genético es como se comprende en una semilla representativa de la planta de espinaca que se depositó en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, en donde el pigmento rojo comprende betacianina, y el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.
- 65 En este contexto, se pretende que "espinacas" comprenda *Spinacia oleracea* L..

El rasgo de la presente invención se determina por un determinante genético semidominante o dominante incompleto. En los casos de dominancia incompleta o semidominancia, el fenotipo del heterocigoto es intermedio entre los dichos progenitores homocigotos. Este tipo de herencia también puede indicarse como herencia intermedia. El determinante genético puede estar presente en estado homocigoto o heterocigoto que resulta en el rasgo fenotípico de la invención.

El determinante genético de la invención se comporta como un único locus semidominante o dominante incompleto. Este locus puede ser un gen o un alelo y también puede incluir elementos reguladores.

En este contexto, el "determinante genético" es el elemento genético subyacente que causa el rasgo fenotípico de la invención. El "rasgo fenotípico" es el fenotipo en cual la planta tiene una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo. La frase "rasgo genético", "rasgo" y "rasgo fenotípico" pueden usarse indistintamente.

Una muestra representativa de semilla de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) que comprende el determinante genético que, cuando está presente, conduce a que las plantas tengan una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, que se depositó el 6 de abril de 2012 en el NCIMB en Aberdeen bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956. Todas las semillas del depósito comprenden el determinante genético de forma homocigota. Los depósitos no cumplen los requisitos de uniformidad y estabilidad y por lo tanto, no constituyen variedades vegetales.

El determinante genético que confiere el rasgo fenotípico de la invención es transferible a todos los tipos de *Spinacia oleracea* L., tales como los tipos de espinacas saboya, semisaboya y lisa.

La coloración roja de las hojas completas o parciales de las plantas de la invención es un color rojo púrpura o rojo borgoña. El color rojo de las hojas completas o parciales de las plantas de la invención es fácilmente observable por el experto en la técnica pero también puede determinarse mediante el uso de la carta de colores RHS (The Royal Horticultural Society, Londres, Reino Unido). En esta carta la coloración roja de la invención se asemeja a los colores 187A, 187B, 187C, 187D, N186B, N186C o N186D.

Una planta de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) que comprende el determinante genético de la invención puede comprender el determinante genético en un estado heterocigoto.

Las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma heterocigota pueden identificarse por la coloración roja de las hojas de la invención como se representa en la Figura 2B, opcionalmente ya en el momento en que las dos primeras hojas de las plantas están en la etapa de cosecha, preferentemente en el momento en que las primeras dos hojas de la planta están completamente desarrolladas.

El término "etapa cosechable" es claro para el cultivador experto de espinacas y significa, en particular, la etapa de hoja desde la etapa de hoja tierna hasta la etapa de hoja madura, antes de que la planta de espinaca comience a florecer y se desarrolle un tallo de inflorescencia. La frase "etapa cosechable", "etapa de cosecha" y "etapa de cosecha" pueden usarse indistintamente.

El cultivador experto de espinacas sabe cuándo se alcanza la etapa de hoja tierna y la espinaca es cosechable. Cuanto más jóvenes son las plantas en el momento de la cosecha, más pequeñas y tiernas son sus hojas, algo que aprecia el cliente. Por otra parte, si las espinacas se cosechan muy pronto, el productor obtendrá menos kilogramos de producto de su campo. El cultivador experto de espinacas equilibrará estas dos cosas para obtener el máximo beneficio. La espinaca de hoja tierna, típicamente se cultiva a una densidad de 8 millones de semillas/ha y se cosecha cuando las plantas de espinaca tienen aproximadamente 10 cm de altura, aunque la espinaca de hoja tierna puede cosecharse incluso antes y/o cultivar a una densidad diferente. En la etapa de hoja tierna, típicamente la planta de espinaca tiene al menos dos hojas completamente desarrolladas. Con hojas se entiende que las hojas verdaderas comienzan a desarrollarse después de que se han formado los cotiledones.

En las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma heterocigota, las hojas son al menos parcialmente rojas en la etapa de cosecha. En particular, dichas plantas tienen pecíolos rojos y limbos con nervaduras primarias y secundarias rojas y una coloración rojiza adicional en las áreas foliares de la superficie adaxial (es decir, el lado superior) de la hoja entre estas nervaduras. Un ejemplo de tal planta se presenta en la Figura 2B. En dichas plantas de la invención, la coloración roja no se limita, por lo tanto, a los pecíolos y al área foliar en las nervaduras principales.

El porcentaje de la hoja que muestra una coloración rojiza en las plantas que portan el determinante genético de la invención difiere de forma heterocigota de un fondo genético a otro, pero siempre es mayor que en las plantas de espinaca de nervadura roja que no portan el determinante genético de la invención, cuando se cultivan bajo circunstancias idénticas.

En algunas plantas que portan el determinante genético de la invención de forma heterocigota, la coloración roja puede estar más confinada a las áreas cercanas a las nervaduras principales de la hoja, mientras que en otras plantas que portan el determinante genético de la invención de forma heterocigota, el pigmento rojo puede estar presente en las células de la epidermis de la hoja en casi todo el limbo.

Las plantas de la invención pueden analizarse al examinar si las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de la superficie adaxial y abaxial de la hoja son rojas. Esto puede hacerse mediante desprendimiento de la capa de células de la epidermis, o bien, de la superficie adaxial o abaxial de la hoja con unas pinzas afiladas y la subsecuente microscopía de luz transmitida.

En las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma heterocigótica, aproximadamente, en orden de mayor preferencia, 10-100 %, 15-90 %, 20-80 %, 30-70 % de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, que excluye las células del complejo estomático, comprende un pigmento rojo. En particular, en las plantas de la invención que portan de forma heterocigota el determinante genético, aproximadamente 15-80 %, más en particular 20-80 % y aún más en particular 30-80 % de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial, que excluye las células del complejo estomático, comprenden un pigmento rojo.

En una modalidad, la invención se refiere a una planta de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) que comprende el determinante genético de la invención en un estado homocigoto.

Las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota pueden identificarse por sus pecíolos rojos y la coloración roja de sus hojas, opcionalmente ya en el momento en que las dos primeras hojas de las plantas están en etapa de cosecha, preferentemente en el momento en que las dos primeras hojas de la planta está completamente desarrollada.

En la Figura 2A se presenta un ejemplo de una planta de la invención que porta el determinante genético de forma homocigota.

Las plantas de la invención que portan de forma homocigota el determinante genético tienen una coloración roja de las partes vegetativas de la planta que se encuentran sobre el suelo.

El término "partes vegetativas de la planta sobre el suelo" tal como se usa en la presente descripción pretende significar las partes de la planta sobre el suelo que no están involucradas en la reproducción sexual, que excluye el hipocótilo y los cotiledones, que incluye las hojas, el tallo y los pecíolos.

Se encontró que las inflorescencias y las flores de las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota también pueden tener una coloración roja.

Las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota, tienen una coloración roja sobre toda la superficie de las hojas de la planta en la etapa de cosecha. Dichas plantas en particular tienen una coloración roja uniforme sobre toda la superficie de las hojas de la planta en la etapa de cosecha.

El color rojo de las partes vegetativas sobre el suelo, y en particular las hojas en la etapa de cosecha, de las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota es un color rojo púrpura o rojo borgoña.

El rojo, como se usa en esta solicitud, incluye el color que se percibe como púrpura.

El color rojo de las partes vegetativas sobre el suelo de las plantas de la invención puede determinarse mediante el uso de la carta de colores RHS (The Royal Horticultural Society, Londres, Reino Unido) y se selecciona preferentemente de colores con los códigos RHS 187A, 187B, 187C, 187D, N186B, N186C y/o N186D, o sus combinaciones. Este color rojo es particularmente visible en plantas cultivadas a partir de semillas depositadas en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956. En diferentes tipos o variedades de espinacas, el color puede diferir, pero el experto aún lo percibirá como rojo.

Aunque la carta de colores RHS se usa comúnmente por los obtentores y cultivadores para determinar los colores de las plantas, está claro que el color también puede determinarse mediante el uso de otras cartas o sistemas de colores. Los colores también pueden especificarse, por ejemplo, en códigos de color RGB, mediante el uso del sistema de color Munsell o pueden determinarse mediante el uso de un colorímetro. El experto conoce cómo usar estos diferentes sistemas de color y convertir códigos de color entre los diferentes sistemas de color. Los valores RGB, CIELab y CIELCh para estos colores RHS se listan en la tabla más abajo.

RHS	sRGB			CIE Lab D65 / 10°			CIE LCh D65 / 10°		
	R	G	B	L	a	b	L	C	h
N186B	74	63	77	28	8	-8	28	11	318
N186C	96	62	70	30	16	1	30	16	3
N186D	131	53	79	34	37	1	34	37	1
187A	92	53	62	27	19	2	27	19	5
187B	113	51	66	30	29	4	30	29	7
187C	129	55	72	34	34	5	34	34	8
187D	148	54	85	37	43	2	37	42	3

En particular, al menos la superficie adaxial, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial, de las hojas cosechables de las plantas de la invención que portan de forma homocigota el determinante genético tienen el color como se definió anteriormente.

El pigmento rojo de las hojas cosechables de las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota se localiza principalmente en la epidermis de la hoja (como se muestra en la Figura 3H) de, al menos, la superficie adaxial, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial, de la hoja (como se representa en la Figura 3G).

Dentro de la epidermis de la hoja, el pigmento rojo se comprende dentro de las células de la epidermis, que excluye las células protectoras del complejo estomático. Dicho pigmento rojo puede estar presente en células adicionales además de la epidermis.

En las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota, aproximadamente, en orden de mayor preferencia, 50-100 %, 60-100 %, 70-100 %, 80-100 %, 90-100 %, 95-100 % de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial, que excluyen las células del complejo estomático, comprenden un pigmento rojo. En particular, en las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota, aproximadamente 90-100 %, más en particular 95-100 % y aún más en particular 99-100 % de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial, que excluyen las células del complejo estomático, comprenden un pigmento rojo.

En una modalidad, la invención se refiere a una planta de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) que comprende el determinante genético de la invención, en donde el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos, en orden de mayor preferencia, 80 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 90 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 100 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 110 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 120 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 130 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 140 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 150 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 160 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 170 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 180 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 190 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 200 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 210 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 220 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 230 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 240 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 250 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 300 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 350 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 400 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 450 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 500 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 550 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 600 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco. El contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha no es adecuadamente mayor que 1000 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.

En particular, el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 90 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, más en particular, el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 160 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, incluso más en particular, el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 200 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.

Las betacianinas son los pigmentos rojo-púrpura que se encuentran dentro del grupo de las betalainas. Las betalainas son compuestos solubles en agua que contienen nitrógeno derivados de la tirosina que se encuentran solo en un número limitado de linajes de plantas (Tanaka y otros, The Plant Journal (2008) 54, 733-749). Las betalainas muestran colores brillantes en flores, frutos y otras partes de plantas de especies pertenecientes a las familias de Caryophyllales, excepto para Caryophyllaceae y Molluginaceae. Las betalainas de la remolacha roja (*Beta vulgaris*) se usan como un colorante natural. La ventaja del color de betalaína es que el color no depende del pH y es más estable que el de las antocianinas. Las betalainas se clasifican en betacianinas rojas (carmesí, púrpura, violeta) y betaxantinas amarillas. Son conjugados de imonio de ácido betalámico con glucósido de ciclodihidroxifenilalanina (cDOPA) y aminoácidos o aminos, respectivamente. Solo las betacianinas son modificadas por fracciones glucosilo o acilo. Se han aislado e identificado más de 50 especies moleculares de betacianinas y varias betaxantinas. Las betalainas se acumulan en vacuolas en las capas de tejido de la epidermis y subepidérmico, tanto en tejidos vegetativos como reproductivos.

Los ejemplos de betacianinas son betanina, isobetanina, probetanina, neobetanina, amarantina, isoamarantina, iresinas (amaranto acilado), celosianinas (amaranto acilado), gomfrenina I, isogomfrenina I, gomfreninas aceladas. El nivel relativo y la ausencia o presencia de cada uno de estos pigmentos en plantas que producen betacianinas varía entre especies.

El contenido de betacianina en cualquier tejido vegetal puede medirse por la preparación de una solución de muestra en un tampón de extracción, que mide el espectro de absorbancia mediante el uso de un espectrofotómetro y que cuantifica el pico de absorbancia de betacianina. Alternativamente, el contenido total de betacianina puede medirse mediante el uso de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), posiblemente combinada con métodos de espectrometría de masas como, por ejemplo, MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz) o Q-TOF (espectrometría de masas en tándem). Mediante el uso de HPLC o métodos de espectrometría de masas como MALDI-TOF o Q-TOF es posible identificar los niveles de diferentes betacianinas (como por ejemplo betanina, amarantina, gomfrenina). A continuación, puede calcularse el contenido total de betacianina por adición de los niveles de los diferentes pigmentos de betacianina identificados. El experto conoce cómo realizar tales análisis y hacer tales cálculos.

El contenido de betacianina de las hojas de las plantas de espinaca en la etapa de cosecha puede medirse al tomar una muestra representativa de, por ejemplo, aproximadamente 200 gramos de peso fresco de la porción aérea cosechada en la etapa de hoja madura y tomar muestras, por ejemplo, dos muestras de 5-10 plantas para servir como réplicas.

En caso de que se usa un tampón de fosfato de potasio (250 mM, pH = 5) como un líquido de extracción y el espectro de absorbancia se mida mediante el uso de un espectrofotómetro, debe determinarse al menos la absorbancia a 537 nm para determinar el contenido de betacianina de la muestra. El experto puede entonces calcular la cantidad de betacianina total mediante el uso de una fórmula que usa el coeficiente de extinción de, por ejemplo, la betanina en dicho tampón usado de fosfato de potasio. En ese caso, el nivel total de betacianina puede darse en µg equivalentes de betanina/g de peso fresco (FW).

Los valores para el contenido de betacianina que se listan en la presente descripción se han obtenido mediante el uso de un tampón de fosfato de potasio (250 mM, pH = 5) como un líquido de extracción, que mide la absorbancia de la muestra a 537 nm mediante el uso de un espectrofotómetro y que calcula la cantidad de betacianina total mediante el uso de una fórmula que usa el coeficiente de extinción de la betanina en dicho tampón de fosfato de potasio.

En una planta de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) que comprende el determinante genético de la invención, la relación entre la clorofila total y la betacianina total calculada en equivalentes de betanina (µg de clorofila total/g de peso fresco dividido por µg equivalentes de betanina/g de peso fresco) de las hojas en etapa de cosecha se encuentra, en orden de mayor preferencia, entre 0,001 y 29, entre 0,01 y 25, entre 0,10 y 15, entre 0,25 y 10, entre 0,5 y 5. En particular, la relación entre la clorofila total y la betacianina total calculada en equivalentes de betanina (µg de clorofila total/g de peso fresco dividido por µg equivalentes de betanina/g de peso fresco) de las hojas en la etapa de cosecha se encuentra entre 0,10 y 15, preferentemente entre 0,5 y 5.

El contenido de clorofila total de las hojas de las plantas de espinaca en la etapa de cosecha puede medirse al tomar una muestra representativa de, por ejemplo, aproximadamente 200 gramos de peso fresco de la porción sobre el suelo cosechada en la etapa de cosecha, preferentemente en una etapa aproximadamente idéntica para las plantas de espinacas a comparar, y tomar, por ejemplo, dos muestras de 5-10 plantas cada una para que sirvan como réplicas. El contenido de clorofila total, por ejemplo, puede determinarse, al medir el espectro de absorbancia de la solución de muestra en el líquido de extracción mediante el uso de un espectrofotómetro, que cuantifica el pico de absorbancia de clorofila A y clorofila B y que calculando el nivel de clorofila total. El experto está familiarizado con estos métodos.

La invención también se refiere a las plantas de espinaca de la invención, que pueden obtenerse al cruzar una primera planta de espinaca con una segunda planta de espinaca, en donde al menos una de dichas plantas comprende el determinante genético como se comprende en una semilla representativa de la planta de espinaca que se depositó bajo los números de acceso del NCIMB, NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, o una planta progenie de la misma que porte el determinante genético, y seleccionar, preferentemente en la generación F2, plantas que tienen una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, en donde el pigmento rojo comprende betacianina y el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.

El rasgo de la invención puede incorporarse a una planta de espinaca de tipo silvestre al cruzar la planta de tipo silvestre con una planta que sea, o bien, homocigota o heterocigota para el determinante genético de la invención y seleccionar el fenotipo deseado en la progenie de ese cruce, preferentemente en la F1 y F2 de ese cruce, y

seleccionar las plantas que tienen una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo.

5 Cuando se usa una planta de la invención que porta el determinante genético de forma heterocigota en un cruce con una planta de tipo silvestre, es necesaria tal selección en la F1 de ese cruce, ya que en ese caso solo aproximadamente 50 % de las plantas F1 portarán el determinante genético de la invención.

10 Cuando se usa una planta de la invención que porta el determinante genético de forma homocigota en un cruce con una planta de tipo silvestre, por otra parte, normalmente todas las plantas F1 de ese cruce portarán el determinante genético de la invención de forma heterocigota y pueden usarse para la autofecundación para producir poblaciones F2 que también contienen plantas que portan el determinante genético de la invención de forma homocigota.

15 Las plantas de espinaca que portan el determinante genético de la invención que conduce al rasgo que tiene una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, en donde el pigmento rojo comprende betacianina y el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, puede identificarse adecuadamente entre los descendientes de un cruce entre una planta que no comprende el determinante genético, y una planta que comprende el determinante genético en un estado homocigoto, al cultivar plantas F2 a partir de, por ejemplo, aproximadamente 12 semillas que son el resultado del cruce inicial y una etapa de autofecundación, y seleccionar plantas que muestran el rasgo deseado de la invención.

25 Alternativamente, las plantas de espinaca que portan el determinante genético de la invención que conduce al rasgo que tiene la coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, en donde el pigmento rojo comprende betacianina, y el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, puede identificarse adecuadamente entre los descendientes de un cruce entre una planta que no comprende el determinante genético y una planta que comprende el determinante genético en un estado heterocigoto, la selección de plantas F1 resultantes del cruce inicial que muestran el rasgo fenotípico de las plantas que comprenden el determinante genético de la invención de forma heterocigota, que autopolinizan esas plantas y cultivan plantas F2 a partir de, por ejemplo, aproximadamente 12 semillas que producen, y seleccionar plantas que muestren el rasgo deseado.

35 La selección de las plantas puede realizarse fenotípicamente, ya que tanto las plantas que portan el determinante genético en estado homocigoto como las que portan el determinante genético en estado heterocigoto pueden identificarse fácilmente por la coloración roja de sus hojas. La coloración roja de las plantas de espinaca de la invención sirve por lo tanto, como marcador visual. Alternativamente, la selección puede realizarse a través de la identificación del determinante genético, por ejemplo, por medio de uno o más marcadores moleculares. Los marcadores pueden desarrollarse en consecuencia por un experto en base al material que se depositó bajo el número NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956.

45 Cuando más de un gen puede ser responsable de un determinado rasgo, puede realizarse una prueba de alelismo para determinar la equivalencia. El experto que realiza la prueba debe asegurarse de que todos los genes relevantes estén presentes de forma homocigota para que la prueba funcione correctamente.

50 Por lo tanto, la equivalencia de los determinantes genéticos puede determinarse mediante una prueba de alelismo. Para realizar una prueba de alelismo, el material que es homocigoto para el determinante conocido, una planta de prueba, se cruza con material que es homocigoto para el determinante genético que se va a probar. Esta última planta se conoce como planta donante. La planta donante que se va a probar debe ser o debe hacerse homocigótica para el determinante genético que se va a probar. El experto conoce cómo obtener una planta que sea homocigota para el determinante genético que se va a probar. Cuando en la F2 del cruce entre una planta donante y una planta de prueba, no se observa segregación para el fenotipo que se relaciona con el determinante genético, se ha comprobado que los determinantes genéticos de la planta donante y la planta de prueba son equivalentes o iguales.

60 También se describe en la presente descripción una planta de espinaca (*Spinacia oleracea*) que comprende un determinante genético que conduce a que la planta tenga una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, cuyo determinante genético es como se comprende o es equivalente al determinante genético que se encuentra en una semilla representativa de la planta de espinaca que se depositó en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956 como puede determinarse mediante el uso de una prueba de alelismo, en particular como se describió anteriormente.

65

Además, se describe en la presente descripción una planta de espinaca que comprende el determinante genético de la invención, en donde dicho determinante genético puede obtenerse por introgresión de una planta cultivada a partir de una semilla que se depositó en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 o NCIMB 41956.

También se describe en la presente descripción una planta de espinaca que comprende un determinante genético que conduce a que la planta tenga una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, en donde dicho determinante genético se introgressa de una planta cultivada a partir de una semilla que se depositó en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 o NCIMB 41956.

La palabra "Introgresión", como se usa en esta solicitud, pretende significar la introducción de un rasgo en una planta que no porta el rasgo por medio de cruzamiento y selección.

De acuerdo con su aspecto adicional, la invención se refiere a semillas de las plantas de espinaca, que comprenden el determinante genético que conduce a que la planta tenga la coloración roja de las hojas de la invención, tal como se encuentra en semillas bajo los números de acceso al depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 o NCIMB 41956, en donde el determinante genético conduce a una planta de espinaca cultivada a partir de dicha semilla que tiene una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, y en donde el pigmento rojo comprende betacianina, y el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco. Una semilla de la invención puede comprender el determinante genético, o bien, de forma heterocigota u de forma homocigota.

Además, en la presente descripción se describe una semilla de la planta de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) de la invención que es capaz de cultivar hasta convertirse en una planta de espinaca de la invención.

Además, también se describe en la presente descripción el uso de una planta de la invención, como germoplasma en un programa de mejoramiento para el desarrollo de plantas de espinacas que tienen una coloración roja de las hojas, en donde la coloración roja de las hojas es el resultado de al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, que comprende un pigmento rojo.

La invención también se refiere a la progenie de una planta de espinaca de la invención, que muestra la coloración roja de las hojas de la invención. Tal progenie puede producirse por reproducción sexual o vegetativa de una planta de la invención o una planta progenie de la misma. La progenie porta el determinante genético que causa el rasgo de la invención y que se encuentra en semillas con números de acceso al depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, o bien en forma homocigota o heterocigota, en donde el determinante genético conduce a una planta de espinaca cultivada de dicha semilla que tiene una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, y en donde el pigmento rojo comprende betacianina y el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es de al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.

Cuando el determinante genético de la invención está presente en forma homocigota, la planta progenie muestra el rasgo de la invención de la misma o de una manera similar a la planta cultivada a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956. Esto significa que tal progenie tiene la misma coloración roja de las hojas como se reivindicó para la planta de espinaca de la invención. Además de esto, la planta puede ser modificada en una o más características. Tales modificaciones adicionales se efectúan, por ejemplo, mediante mutagénesis o mediante transformación con un transgén.

Como se usa en la presente descripción, la palabra "progenie" pretende significar la descendencia o el primero y todos los demás descendientes de un cruce con una planta de la invención que muestra el rasgo de la invención y/o lleva el determinante genético subyacente al rasgo. La progenie de la invención comprende los descendientes de cualquier cruzamiento con una planta de la invención que porta el determinante genético que causa el rasgo de la invención. Tal progenie puede obtenerse, por ejemplo, al cruzar una primera planta de espinaca con una segunda planta de espinaca, en donde una de las plantas se cultivó a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, pero también puede ser la progenie de cualquier otra planta de espinaca que porte el determinante genético presente en NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956.

Dichas plantas progenie comprenden un determinante genético que comprende uno o más Locus de Rasgos Cuantitativos (QTL) que causan el rasgo fenotípico de la invención, en donde dicho determinante genético puede

obtenerse de una planta de espinaca cultivada a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa bajo los números de acceso NCIMB, NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956. Por lo tanto, el rasgo de la invención tiene una base genética en el genoma de una planta de espinaca, y por ejemplo, mediante el uso del método de fenotipado descrito en el Ejemplo 2, las plantas de espinaca pueden identificarse como plantas de la invención.

La invención se refiere además al material de propagación de una planta de la invención, en donde dicho material de propagación comprende el determinante genético que causa el rasgo de la invención. El material de propagación se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste en microesporas, polen, ovarios, óvulos, sacos embrionarios y óvulos. La invención se refiere, también, a material de propagación que puede cultivarse como una planta de la invención.

El material de propagación se selecciona del grupo que consiste en microesporas, polen, ovarios, óvulos, embriones, sacos embrionarios, óvulos, esquejes, raíces, puntas de raíces, hipocótilos, cotiledones, tallos, hojas, flores, anteras, semillas, células meristemáticas, protoplastos, callos y células.

La invención se refiere además al cultivo de tejidos del material de propagación.

Además, se describen en la presente descripción partes de la planta de espinaca de la invención que son adecuadas para la reproducción vegetativa, en particular esquejes, raíces, tallos, células, protoplastos, callos y cultivos de tejido de la planta de espinaca de la invención. El cultivo de tejidos comprende células regenerables, tal cultivo de tejidos puede derivarse de hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocótilos, células meristemáticas, puntas de raíces, anteras, flores, semillas y tallos. El material de propagación porta el determinante genético que causa el rasgo de la invención, o bien, en forma homocigota o heterocigota.

También se describe en la presente descripción una planta de espinaca cultivada o regenerada a partir de dicho material de propagación de una planta de la invención, cuya planta de espinaca tiene una coloración roja de las hojas, en donde la coloración roja de las hojas es el resultado de al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, que comprende un pigmento rojo. El determinante genético subyacente al rasgo fenotípico de la invención está presente en las semillas depositadas bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956.

Además, en la presente descripción, se describe una célula de una planta de espinaca de la invención, cuya célula comprende un determinante genético que conduce a que la planta tiene una coloración roja de las hojas de la invención, en donde dicho determinante está presente en una planta de espinaca cultivada a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956. Dicha planta de espinaca puede obtenerse al cruzar una planta de espinaca con una segunda planta de espinaca, en particular una planta de espinaca cultivada a partir de semillas depositadas bajo el número de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 o NCIMB 41956, y seleccionar una planta de espinaca que tiene el rasgo de la invención. Dicha célula comprende, por lo tanto, la información genética que codifica dicho rasgo de la invención, en particular información genética que es sustancialmente idéntica, preferentemente idéntica completamente a la información genética que codifica dicho rasgo de la planta de espinaca cultivada a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa bajo los números de acceso de NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, más en particular el determinante genético descrito en la presente descripción. Preferentemente, la célula como se describe en la presente descripción es parte de una planta o parte de una planta, pero la célula también puede estar en forma aislada.

También se describe en la presente descripción el uso de semillas con número de acceso de NCIMB, NCIMB 41954, NCIMB 41955 o NCIMB 41956, para transferir el determinante genético de la invención, que confiere el rasgo de la invención, a otra planta de espinaca.

Además, se describe en la presente descripción, el uso de una planta de espinaca, cuya planta porta el determinante genético de la invención, que confiere el rasgo de la invención, como se presenta y puede obtenerse a partir de una planta de espinaca, cultivada a partir de semillas con número de acceso de NCIMB, NCIMB 41954, NCIMB 41955 o NCIMB 41956, como un cultivo.

También se describe en la presente descripción el uso de una planta de espinaca, que porta el determinante genético de la invención que confiere el rasgo de la invención, como se presenta en una planta de espinaca, en particular una planta de espinaca cultivada a partir de una planta de espinaca, cultivada a partir de semillas con número de acceso de NCIMB, NCIMB 41954, NCIMB 41955 o NCIMB 41956, como una fuente de semillas.

Además, se describe en la presente descripción el uso de una planta de espinaca, que porta el determinante genético que confiere el rasgo de la invención presente en una planta de espinaca, en particular una planta de espinaca cultivada a partir de semillas con número de acceso de NCIMB, NCIMB 41954, NCIMB 41955 o NCIMB 41956, como fuente de material de propagación.

Además, se describe en la presente descripción el uso de una planta de espinaca, que porta el determinante genético que confiere el rasgo de la invención, tal como está presente en una planta de espinaca, en particular una planta de espinaca cultivada a partir de semillas con número de acceso de NCIMB, NCIMB 41954, NCIMB 41955 o NCIMB 41956, para su consumo.

También se describe en la presente descripción el uso de una planta de espinaca, que porta el determinante genético que confiere el rasgo de la invención, alelos presentes en semillas con número de acceso de NCIMB, NCIMB 41954, NCIMB 41955 o NCIMB 41956, para conferir el determinante genético que conduce a el rasgo de la invención a una planta de espinaca.

Además, se describe en la presente descripción el uso de una planta de espinaca, como un receptor del determinante genético presente en las semillas con número de acceso de NCIMB, NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956.

También se describen en la presente descripción las plantas de espinaca que comprenden el determinante genético que causa el rasgo de la invención y que han adquirido dicho determinante genético mediante la introducción de la información genética que es responsable del rasgo de una fuente adecuada, o bien, por reproducción convencional, o modificación genética, en particular por cisgénesis o transgénesis. La cisgénesis es la modificación genética de plantas con un gen natural, que codifica un rasgo (agrícola) de la propia planta cosechada o de una planta donante sexualmente compatible. La transgénesis es la modificación genética de una planta con un gen de una especie no cruzable o con un gen sintético.

La fuente de la cual se adquiere la información genética, en particular el determinante genético, puede formarse por plantas cultivadas a partir de las semillas depositadas, o por su descendencia sexual o vegetativa.

La invención también se refiere a las hojas de espinaca de una planta de la invención que tiene una coloración roja, donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, en donde el pigmento rojo comprende betacianina, y el contenido de betacianina de la hoja en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.

Además, se describen en la presente descripción, los productos alimenticios que comprenden dichas hojas de espinaca, o bien, en forma natural u opcionalmente en forma procesada.

También se describen en la presente descripción otras partes cosechadas de una planta de la invención o productos alimenticios. Tal parte cosechada o producto alimenticio puede ser o comprender un tallo, un pecíolo, una raíz, un brote, una inflorescencia, una flor, o cualquier otra parte de una planta de espinaca. Un producto alimenticio preferido que comprende partes de la planta de espinaca de la invención es una ensalada, en donde las hojas de espinaca pueden mezclarse opcionalmente con otras hojas de, por ejemplo, lechuga, escarola, achicoria, remolacha, acelga, etc.

El producto alimenticio o la parte cosechada puede haber pasado por uno o más etapas de procesamiento. Dicha etapa de procesamiento podría comprender, pero no se limita a, cualquiera de los siguientes tratamientos o sus combinaciones: cortar, lavar, cocinar, cocer al vapor, hornear, freír, pasteurizar, congelar, moler, extraer aceite, encurtir, o fermentar. La forma procesada que se obtiene también forma parte de la presente invención.

Las espinacas procesadas también pueden incluirse en otro producto alimenticio, tal como pastel, sopa o un producto de pasta seca o fresca, tal como raviolis, tortellini, canelones, etc. Tal producto alimenticio generalmente está preenvasado y está destinado a la venta en un supermercado. Por lo tanto, también se describe en la presente descripción el uso de plantas de espinaca de la invención o sus partes en la preparación de productos alimenticios, en particular ensaladas, pasteles, sopas y pastas.

En una modalidad adicional, la invención se refiere a una o más plantas de espinaca de la invención en un sustrato de crecimiento en un contenedor para la cosecha de hojas de la planta de espinaca en un entorno doméstico.

Además, se describe en la presente descripción un método para la producción de una planta de espinaca que conduce a que la planta tiene el rasgo de la invención, que comprende:

- a) cruzar una planta que comprende un determinante genético que conduce al rasgo con otra planta;
- b) opcionalmente seleccionar plantas en la F1 resultante que tengan el determinante genético y autofecundar las plantas F1 resultantes que tengan el determinante genético para obtener plantas F2;
- c) seleccionar plantas que tengan el rasgo en la F2;
- d) opcionalmente realizar una o más rondas adicionales de autofecundación o cruce, y subsecuentemente, seleccionar una planta que comprenda/muestre el rasgo de la invención.

La palabra "rasgo" en el contexto de esta solicitud se refiere al fenotipo de la planta. En particular, la palabra "rasgo" se refiere al rasgo de la invención, más en particular al rasgo que tiene una coloración roja de las hojas, en donde la coloración roja de las hojas es el resultado de al menos una parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, que comprende un pigmento rojo. El término "determinante genético" se usa para la información genética en el genoma de la planta que causa el rasgo de la invención. Cuando una planta muestra el rasgo de la invención, su genoma comprende el determinante genético que causa el rasgo de la invención. Por lo tanto, la planta tiene el determinante genético de la invención.

Está claro que el progenitor que proporciona el rasgo de la invención no es necesariamente una planta cultivada directamente a partir de las semillas depositadas. El progenitor también puede ser una planta progenie a partir de la semilla o una planta progenie a partir de semillas que se identifican que tienen el rasgo de la invención por otros medios.

Además, se describe en la presente descripción un método para la producción de una planta de espinaca que conduce a que la planta tiene el rasgo de la invención, que comprende:

- a) cruzar una planta que comprende el determinante genético que conduce al rasgo con otra planta;
- b) opcionalmente retrocruzar el F1 resultante con el progenitor preferido;
- c) seleccionar plantas que tengan el rasgo en la F2;
- d) opcionalmente realizar una o más rondas adicionales de autofecundación o cruce, y subsecuentemente seleccionar, una planta que comprenda el rasgo.

La invención proporciona, adicionalmente, un método de introducción de otro rasgo deseado en una planta de *Spinacia oleracea* que tiene el rasgo de la invención, que comprende:

- a) cruzar una planta de espinaca que tiene el rasgo de la invención, cuyas semillas representativas se depositaron bajo los números de depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, con una segunda planta de espinaca, que comprende un rasgo deseado para producir una progenie F1;
- b) seleccionar una progenie F1 que comprenda dicho rasgo de la invención y el rasgo deseado;
- c) cruzar la progenie F1 seleccionada, o bien, con el progenitor, para producir una progenie de retrocruzamiento;
- d) seleccionar la progenie de retrocruzamiento que comprende el rasgo deseado y el rasgo de la invención; y
- e) e) opcionalmente repetir las etapas c) y d) una o más veces en sucesión para producir una cuarta o más alta progenie de retrocruzamiento seleccionada que comprenda el rasgo deseado y el rasgo de la invención. En la presente descripción también se describe una planta de espinaca producida por este método.

La selección de plantas que tienen el rasgo de la invención puede realizarse en la F1 o en cualquier generación adicional. La selección del rasgo de la invención también puede iniciarse en el F2 de un cruce o alternativamente de un retrocruzamiento. La selección de plantas puede hacerse fenotípicamente, lo que detecta indirectamente el determinante genético subyacente al rasgo.

La selección de plantas que tienen el rasgo de la invención también puede iniciarse en la F3 o en una generación posterior.

La planta que comprende el determinante genético es una planta de una línea endogámica, un híbrido, un haploide doble, o de una población de segregación.

La invención proporciona además un método para la producción de una planta de espinaca que tiene el rasgo de la invención, mediante el uso de una técnica de generación de haploides dobles para generar una línea haploide doble que comprenda dicho rasgo.

En la presente descripción también se describe una semilla híbrida que puede cultivarse como una planta que tiene el rasgo de la invención, y un método para producir tal semilla híbrida que comprende cruzar una primera planta progenitora con una segunda planta progenitora y cosechar la semilla híbrida resultante, en donde dicha primera planta progenitora y/o dicha segunda planta progenitora es la planta como se reivindicó.

Además, se describe en la presente descripción un método para producir una planta de espinaca híbrida que tiene el rasgo de la invención, que comprende cruzar una primera planta de espinaca progenitora con una segunda planta de espinaca progenitora y cosechar la semilla híbrida resultante, de la cual la primera planta progenitora y/o la segunda planta progenitora tiene el rasgo de la invención, y cultivar dichas semillas híbridas en plantas híbridas que tienen el rasgo de la invención.

Adicionalmente, se describe en la presente descripción un método para la producción de una planta de espinaca que tiene el rasgo de la invención mediante el uso de una semilla que comprende un determinante genético en su genoma que conduce al rasgo de la invención, para cultivar dicha planta de espinaca. Las semillas son

adecuadamente semillas de las cuales se depositó una muestra representativa en el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956.

Además, se describe en la presente descripción un método para la producción de semillas que comprende cultivar plantas de espinaca a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa en el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, al permitir que las plantas produzcan semillas, y cosechar dichas semillas. La producción de semillas se realiza adecuadamente mediante cruce o autofecundación.

Además, se describe en la presente descripción un método para la producción de una planta de espinaca que tiene el rasgo de la invención mediante el uso de cultivo de tejidos.

También se describe en la presente descripción un método para la producción de una planta de espinaca que tiene el rasgo de la invención mediante el uso de reproducción vegetativa.

Además, se describe en la presente descripción un método para la producción de una planta de espinaca que tiene el rasgo de la invención mediante el uso de un método de modificación genética para introgresar dicho rasgo en la planta de espinaca. La modificación genética comprende la modificación transgénica o transgénesis, mediante el uso de un gen de una especie no cruzable o un gen sintético, y la modificación cisgénica o cisgénesis, mediante el uso de un gen natural, que codifica un rasgo (agrícola), de la planta de cultivo en sí o de una planta donante sexualmente compatible.

También se describe en la presente descripción un método de cultivo para el desarrollo de plantas de espinaca que tienen la característica de la invención en donde se usa germoplasma que comprende dicho rasgo. La semilla representativa de dicha planta que comprende el determinante genético y que es representativa del germoplasma se depositó en el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956.

También se describe en la presente descripción un método para la producción de una planta de espinaca que tiene el rasgo de la invención en donde la progenie o el material de propagación de una planta que comprende el determinante genético que confiere dicho rasgo se usa como fuente para introducir dicho rasgo en otra planta de espinaca. La semilla representativa de dicha planta que comprende el determinante genético se depositó en el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956.

La invención proporciona preferentemente una planta de espinaca que tiene el rasgo de la invención, cuya planta es obtenible mediante cualquiera de los métodos que se describen en la presente descripción y/o familiares para el experto.

La invención proporciona además un método para seleccionar una planta de espinaca que tiene una coloración roja de las hojas, en donde la coloración roja de las hojas es el resultado de al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, que comprende un pigmento rojo, cuyo método comprende el cribado de las plantas para detectar la presencia de la coloración roja de las hojas como en la presente descripción se describen.

Además, en la presente descripción se describe un gen mutado que hace que una planta de espinaca tiene una coloración roja de las hojas, en donde la coloración roja de las hojas es el resultado de al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, que comprende un pigmento rojo, y cuyo gen mutado está presente en el genoma de las plantas de las cuales se depositó una muestra representativa bajo los números de acceso al depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956.

También se describe en la presente descripción el uso de un determinante genético que causa una coloración roja de las hojas, en donde la coloración roja de las hojas es el resultado de al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, que comprende un pigmento rojo, para producir una planta con hojas rojas, en particular una planta de espinaca con hojas rojas, cuyo determinante genético está presente en el genoma de plantas de las cuales una muestra representativa se depositó bajo los números de acceso al depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956.

Además, se describe en la presente descripción una planta no natural que tiene una coloración roja de las hojas, en donde la coloración roja de las hojas es el resultado de al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, que comprende un pigmento rojo, y cuya coloración roja es el resultado de la presencia en el genoma de la planta de un determinante genético que está presente en el genoma de las plantas de las que una muestra representativa fue depositada bajo los números de acceso al depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956. La planta no natural es en particular una planta mutante.

El término "rasgo de la invención", como se usa en la presente descripción, se define como el rasgo que conduce a que la planta de espinaca de la invención tiene una coloración roja de las hojas, en donde la coloración roja de las hojas es el resultado de al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, que comprende un pigmento rojo.

Depósitos

Las semillas de *Spinacia oleracea* L. 12,3002, 12,3007 y 12,3009 que comprenden el determinante genético de la invención que conduce a que la planta tenga una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de la superficie adaxial y/o abaxial de la hoja comprenden un pigmento rojo, se depositaron con NCIMB Ltd, Ferguson Building, Estado Craibstone, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido, el 6 de abril de 2012 bajo los números de acceso al depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956. Las semillas de estos depósitos comprenden el determinante genético en un estado homocigoto.

Las semillas depositadas no cumplen los criterios DUS, los cuales se requieren para obtener la protección de las variedades de plantas y, por lo tanto, no pueden considerarse variedades de plantas.

Figuras

La invención se ilustrará adicionalmente en los ejemplos que siguen y que se proporcionan únicamente con propósitos ilustrativos y de ningún modo pretenden limitar el alcance de la invención. En los ejemplos se hace referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: Imagen y representación esquemática de una hoja de espinaca. Se indican el pecíolo, la lámina (también llamada base de la hoja) y las nervaduras primarias (también llamada nervadura media), secundaria y terciaria de la hoja.

Figura 2: A: Imagen y representación esquemática de una planta de espinaca de la invención que porta el determinante genético de forma homocigota. En la representación esquemática de una planta de la invención el sombreado indica áreas de la planta que tienen un color rojo; las líneas discontinuas indican las nervaduras que tienen un color rojo. Las líneas que no son discontinuas indican nervaduras que no están coloreadas de rojo.

B: Imagen y representación esquemática de una planta de espinaca de la invención que porta el determinante genético de forma heterocigota. En la representación esquemática se dibuja tanto un ejemplo de una planta completa como un ejemplo de una hoja de tal planta. El sombreado indica áreas de la planta que tienen un color rojo; las líneas discontinuas indican las nervaduras que tienen un color rojo. Las líneas que no son discontinuas indican nervaduras que no están coloreadas de rojo.

C: Imagen y representación esquemática de una planta de una variedad de espinaca verde (Squirrel). El sombreado indica áreas de la planta que tienen un color rojo; las líneas discontinuas indican las nervaduras que tienen un color rojo. Las líneas que no son discontinuas indican nervaduras que no están coloreadas de rojo.

D: Imagen y representación esquemática de una planta de espinaca con hojas verdes con pecíolos rojos y nervaduras principales rojas (espinaca nervada roja). En la representación esquemática se dibuja tanto un ejemplo de una planta completa como un ejemplo de una hoja de tal planta. El sombreado indica áreas de la planta que tienen un color rojo; las líneas discontinuas indican las nervaduras que tienen un color rojo. Las líneas que no son discontinuas indican nervaduras que no están coloreadas de rojo.

Figura 3: A: Imagen y representación esquemática de la cara adaxial (superior) de una hoja de espinaca de la invención. El rectángulo (b) indica un ejemplo de un área de la hoja entre las nervaduras para tomar tiras de la epidermis tal como las que se muestran en la Figura 3C-F. La línea punteada (a) indica un ejemplo de donde puede tomarse una sección transversal de la hoja tal como las que se presentan en las Figuras 3G y 3H, que no incluyen cualquiera de las nervaduras principales.

B: Imagen y representación esquemática del lado abaxial (inferior) de una hoja de espinaca de la invención. El rectángulo (b) indica un ejemplo de un área de la hoja entre las nervaduras para tomar tiras de la epidermis tal como las que se muestran en la Figura 3C-F.

C: Epidermis de un área entre las nervaduras de una hoja de una planta de la invención que porta el determinante genético de forma homocigota. El sombreado indica células que tienen un color rojo y por lo tanto, comprenden un pigmento rojo. Un ejemplo de tal célula se indica mediante (2). Un ejemplo de una célula de la epidermis que no comprende un pigmento rojo se indica mediante (3). En la epidermis se encuentran los estomas (1), las células de los estomas (también llamadas células protectoras) no tienen color rojo.

D: Epidermis de un área entre las nervaduras de una hoja de una planta de la invención que porta el determinante genético de forma heterocigota. El sombreado indica células que tienen un color rojo y por lo tanto, comprenden un pigmento rojo. Un ejemplo de tal célula se indica mediante (2). Un ejemplo de una célula de la epidermis que no comprende un pigmento rojo se indica mediante (3). En la epidermis se encuentran los estomas (1), las células de los estomas (también llamadas células protectoras) no tienen color rojo.

E: Epidermis de un área entre las nervaduras de una hoja de una planta de espinaca verde. El sombreado indica células que tienen un color rojo y por lo tanto, comprenden un pigmento rojo. En este caso ninguna célula de la tira de la epidermis tiene color rojo. Un ejemplo de una célula de la epidermis que no comprende un pigmento rojo se indica mediante (3). En la epidermis se encuentran los estomas (1), las células de los estomas (también llamadas células protectoras) no tienen color rojo.

F: Epidermis de un área entre las nervaduras de una hoja de una planta con hojas verdes con pecíolos rojos y nervaduras principales rojas (espinaca nervada roja). El sombreado indica células que tienen un color rojo y por lo tanto, comprenden un pigmento rojo. En este caso ninguna célula de la tira de la epidermis tiene color rojo. Un ejemplo de una célula de la epidermis que no comprende un pigmento rojo se indica mediante (3). En la epidermis se encuentran los estomas (1), las células de los estomas (también llamadas células protectoras) no tienen color rojo.

G: Imagen y representación esquemática de una sección transversal de una hoja de una planta de la invención. El sombreado en la representación esquemática indica células que tienen un color rojo y por lo tanto, comprenden un pigmento rojo.

H: Imagen y representación esquemática de una sección transversal de una hoja de una planta de la invención. En esta sección transversal solo son visibles una capa de células de la epidermis y varias capas de células mesófilas. El sombreado en la representación esquemática indica células que tienen un color rojo y por lo tanto, comprenden un pigmento rojo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Desarrollo de la planta de la invención

La planta de espinaca de la invención se obtuvo de la siguiente manera: se sometieron a tratamiento EMS las semillas de una población de cribado de espinaca Rijk Zwaan con hojas verdes con pecíolos rojos y nervaduras principales rojas. Estas semillas tratadas con EMS se sembraron y cultivaron para la producción masiva de semillas. Las semillas resultantes se sembraron y las plantas se cultivaron en el campo Rijk Zwaan en Fijnaart para la selección fenotípica de la coloración roja de las hojas. Algunas rondas adicionales de autofecundación y selección dieron lugar a semillas de *Spinacia oleracea* L. 12,3002, 12,3007 y 12,3009 que comprenden el determinante genético de la invención. Estas semillas se depositaron en NCIMB Ltd, Ferguson Building, Estado Craibstone, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido, el 6 de abril de 2012 bajo los números de acceso al depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956. Las semillas de estos depósitos comprenden el determinante genético en un estado homocigoto.

Ejemplo 2

Caracterización fenotípica de las plantas de la invención

Las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota podrían identificarse fácilmente cuando se cultivan bajo condiciones de crecimiento normales en el invernadero o en el campo desde el momento en que las dos primeras hojas de las plantas están completamente desarrolladas, por sus pecíolos rojos y la coloración roja de sus hojas (vea Figura 2A). La coloración roja se calificó mediante el uso de la carta de colores RHS (The Royal Horticultural Society, Londres, Reino Unido). Tanto la superficie superior (adaxial) como la inferior (abaxial) del limbo de las hojas de las plantas de la invención que portaban de forma homocigota el determinante genético tenían un color rojo púrpura (vea Figura 3A + B) que se calificó como 187A, N186C o en algunos casos N186B, todos en el grupo púrpura grisáceo.

El color del pecíolo y el color de la capa de la epidermis en la nervadura primaria, también llamada nervadura media o nervadura central, generalmente era más claro que el del resto del limbo de la hoja. En la superficie abaxial de las hojas, las nervaduras secundarias también, generalmente están marcadas por un color más claro que el resto del limbo de la hoja. El color de los pecíolos de las hojas de las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota se calificó como 187B, 187C, 187D o N186D, todos en el grupo gris-púrpura. En la nervadura primaria del limbo, el color se puntuó 187A, 187B, 187C, 187D, N186C o N186D, mientras que el color de las nervaduras secundarias en la superficie abaxial de las hojas se puntuó 187A, 187B, 187C o 187D, todo en el grupo gris-púrpura.

Las plantas que portaban el determinante genético de forma heterocigota de la invención tenían pecíolos rojos y limbos verdes con nervaduras primarias y secundarias rojas y una coloración rojiza adicional en las áreas foliares de la superficie adaxial de la hoja entre estas nervaduras (vea Figura 2B).

- 5 El porcentaje de la hoja que muestra una coloración rojiza en las plantas que portan el determinante genético de la invención difiere de forma heterocigota de un fondo genético a otro, pero siempre es mayor que en las plantas de espinaca de nervaduras roja que no portan el determinante genético de la invención, cuando se cultivan bajo condiciones idénticas o circunstancias similares.
- 10 En algunas plantas que portan el determinante genético de la invención de forma heterocigota, la coloración roja puede estar más confinada a las áreas cercanas a las nervaduras principales de la hoja, mientras que en otras plantas que portan el determinante genético de la invención de forma heterocigota, el pigmento rojo puede estar presente en las células de la epidermis de la hoja en casi todo el limbo.
- 15 Cuando se hizo una sección transversal de la hoja de una planta de la invención que porta el determinante genético de forma homocigota, quedó claro que el pigmento rojo que causaba la coloración roja de las hojas estaba localizado principalmente en la capa de la epidermis de la hoja (vea Figura 3H), tanto en el lado adaxial y abaxial de la hoja (vea Figura 3G). El mesófilo que contiene la clorofila (con un color verde) más abajo de las 1 a 3 capa más exterior de las células no se ve afectado (vea Figura 3H), en comparación con una planta que no contiene el determinante genético de la invención.
- 20

Cuando se hace una sección transversal de una hoja mediante el uso de un tejido de hoja fresca (es decir, no fijado ni incrustado), el pigmento rojo puede escaparse de las células dañadas y también hacer que las células que no contienen el pigmento rojo parezcan rojas.

- 25 Adicionalmente, las plantas de la invención se analizaron al examinar si las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, son rojas.
- 30 Se tomaron tiras de la epidermis, por ejemplo de 0,15 X 0,2 cm, de entre las nervaduras de la superficie adaxial y abaxial de la hoja. Primero se cortó la epidermis a lo largo de 3 lados de la tira a tomar. Se insertó una punta fina de las pinzas entre la epidermis y el mesófilo a lo largo del lado restante. Luego se agarró la epidermis y se separó lentamente del mesófilo. Luego, las tiras se transfirieron a un portaobjetos de microscopio con una gota de agua y se cubrieron con un cubreobjetos. Después de esto, se examinó el color de las células de las tiras de la epidermis bajo
- 35 un microscopio de luz de transmisión.

Para evitar confusiones, es importante tomar tales tiras de la epidermis para el análisis de un área del limbo bien alejada de las nervaduras de color rojo.

- 40 Al tomar y examinar estas tiras de la epidermis, debe tenerse mucho cuidado de no dañar ni perforar ninguna célula de la epidermis, ya que causa que el pigmento rojo se escape de las células y se subestime el porcentaje de células que contienen un pigmento rojo en la epidermis.

- 45 En las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota, aproximadamente 90-100 % de las células de la epidermis, que excluye las células protectoras que forman los estomas, en la tira de la epidermis que tenían un color rojo-rosado brillante y por lo tanto, comprenden el pigmento rojo (vea Figura 3C). En plantas que portan el determinante genético de la invención de forma heterocigota, el 18-67 % de las células de la epidermis en la tira de la epidermis tenían un color rojo-rosado (vea Figura 3D), en dependencia del porcentaje de qué tan cerca de las nervaduras se tomó la tira de la epidermis.

- 50 Ninguna de las células de tiras de la epidermis tomadas de entre las nervaduras de la superficie adaxial o abaxial de la hoja de ambas plantas de espinaca con hojas verdes (vea Figura 3E) y plantas de espinaca con hojas verdes con pecíolos rojos y nervaduras principales rojas, en donde la coloración roja está confinada a los pecíolos y la epidermis por encima de las nervaduras principales (espinaca nervada roja) (ver Figura 3F) tenía un color rojo-rosado. Ninguna de estas células, por lo tanto, mostró un nivel detectable de betacianinas, en la medida de lo cuantificable mediante el uso de este método.
- 55

Ejemplo 3

- 60 *Análisis bioquímico de plantas de la invención.*

- Se analizó el contenido de clorofila y betacianina de las plantas de la invención, y se compararon con plantas de espinaca verde y plantas de espinaca con hojas verdes con pecíolos rojos y nervaduras principales rojas, en donde la coloración roja se limitó a los pecíolos y la epidermis por encima de las nervaduras principales (espinaca nervada roja, como se muestra en la Figura 2D). Todas las plantas se cultivaron en suelo en un invernadero sin calefacción
- 65

en Fijnaart, Países Bajos, en el invierno de 2011-2012. Tanto los niveles de clorofila como los de betacianina se midieron mediante el uso de un método bioquímico.

Las clorofilas totales (clorofila a y b) se midieron a absorbancias de 653 nm y 667 nm, mientras que la betacianina se midió a una absorbancia de 537 nm. Para cada variedad de espinaca, se cosechó una muestra representativa de aproximadamente 200 gramos de peso fresco de la parte aérea de la planta de espinaca en la etapa de hoja madura. Para cada línea de espinaca se tomaron dos muestras de 5-10 plantas cada una para que sirvieran como réplicas.

Las muestras se colocaron en bolsas de plástico y se congelaron inmediatamente a $<-80^{\circ}\text{C}$. Las muestras congeladas se pulverizaron a mano. El material de la hoja pulverizado se molió luego en un Grindomix (Retsch, 5" 3000 rpm seguido de 5" 5000 rpm) mediante el uso de la tapa de flotación libre en presencia de la menor cantidad de nitrógeno líquido necesaria (la muestra debe mantenerse congelada) para obtener un polvo. Luego, este polvo se transfirió a un tubo que se enfrió con nitrógeno líquido y se almacenó a $<-70^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

Para las mediciones de clorofila, se transfirió un gramo del polvo (se anotó la masa exacta) a cada uno de dos matraces de 60 ml. Inmediatamente se añadieron 50 ml de metanol al 100 % a los dos matraces. Se anotó el volumen (ml) usado. La solución de muestra se homogeneizó con un Ultra Turrax durante 1 minuto y se sometió a ultrasonidos en un baño ultrasónico durante 5 minutos a 'set degas'. Una parte de la solución se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 4°C a 13 000 rpm durante 4 min. Se midió el espectro de 360-900 nm y se determinaron las absorbancias a 653 nm y 667 nm (si es necesario después de la dilución con líquido de extracción). La cantidad de clorofila total se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Clorofila total} = 25,5 * A_{653} + 4 * A_{667} \text{ (}\mu\text{g/ml extracto de metanol)}$$

con una corrección para la dilución y conversión a $\mu\text{g/g}$ de peso fresco de la muestra. La fórmula usada para calcular el nivel de clorofila total se tomó de Goodwin T.W. (1976; Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Volumen 2, Capítulo 18, incorporado en la presente descripción por referencia).

Para las mediciones de betacianina, se transfirieron 10 gramos del polvo (se anotó la masa exacta) a cada uno de dos tubos de 50 ml. Se añadió a los dos tubos una cantidad de 4 a 5 veces el volumen de la muestra de tampón de fosfato de potasio (250 mM, pH = 5). Se anotó la masa (g) del tampón usado. La solución de muestra se sometió a ultrasonidos en un baño ultrasónico durante 5 minutos a 'set degas'. Una parte de la solución se colocó en un tubo de 12 ml para posibles reanálisis. Una parte de la solución se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 4°C a 13 000 rpm durante 4 min. Se midió el espectro de 400-800 nm y se determinó la absorbancia a 537 nm (si es necesario después de la dilución con líquido de extracción).

La cantidad de betacianina se calculó con una fórmula que usa el coeficiente de extinción de betanina en el tampón de fosfato de potasio (250 mM, pH = 5) usado. Por lo tanto, el contenido de betacianina se expresa en μg equivalentes de betanina/g de peso fresco (FW).

$$\text{Equivalentes de betanina (}\mu\text{g/g de peso fresco)} = (10 * A_{537} * \text{dilución} * (\text{masa del tampón} + \text{masa de la parte líquida de la muestra})) / (1,1599 * \text{masa de la muestra})$$

en donde 1,1599 es la A_{537} de una solución de 1 mg/100 ml de betanina en tampón de fosfato de potasio (250 mM, pH = 5) usado, y la masa de la parte líquida de la muestra se calcula multiplicando la masa de la muestra (= 10 g) por (1-(porcentaje de materia seca/100)).

Tabla 1

Mediciones de clorofila y betacianina de plantas de la invención, plantas de espinaca con hojas verde y plantas de espinaca con hojas verdes con pecíolos rojos y nervaduras principales rojas, en donde la coloración roja se limitó a los pecíolos y la epidermis por encima de las nervaduras principales. Todas las plantas se cultivaron en suelo en un invernadero sin calefacción en Fijnaart, Países Bajos, en el invierno de 2011-2012. La Squirrel es una variedad de espinaca verde de Rijk Zwaan. La línea de espinacas de nervadura roja de Rijk Zwaan tiene plantas con hojas verdes con pecíolos rojos y nervaduras principales rojas, en donde la coloración roja se limita a los pecíolos y la epidermis en las nervaduras principales. Las poblaciones de plantas de la invención de la línea 12,30002, 12,30007 y 12,30009 se cultivaron a partir de semillas de los depósitos y contienen únicamente plantas que portan el determinante genético de forma homocigota. Los valores medios dados para el contenido de betacianina y clorofila son la media de dos réplicas biológicas por línea de plantas de 5-10 plantas cada una.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Equivalentes de betanina	Squirrel	Línea de espinacas de nervaduras roja RZ	12,30002	12,30007	12,30009
Muestra 1 (µg/g FW)	5	40	450	340	420
Muestra 2 (µg/g FW)	3	50	450	340	450
Media (µg/g PF)	4	43	450	340	440
Clorofila total	Squirrel	Línea de espinacas de nervaduras roja RZ	12,30002	12,30007	12,30009
Muestra 1 (µg/g FW)	1355	1344	1311	1178	1393
Muestra 2 (µg/g FW)	1214	1452	1408	1085	1316
Media (µg/g PF)	1285	1398	1359	1132	1354
Clorofila Total/Equivalentes de betanina	Squirrel	Línea de espinacas de nervaduras roja RZ	12,30002	12,30007	12,30009
Muestra 1 (µg/g FW)	271,0	33,6	2,9	3,5	3,3
Muestra 2 (µg/g FW)	404,7	29,0	3,1	3,2	2,9
Media	337,8	31,3	3,0	3,3	3,1

Como queda claro en la Tabla 1, los niveles de betacianina (equivalentes de betanina por gramo de peso fresco) de las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota fueron significativamente más altos que los medidos para las espinacas WT con hojas verdes con pecíolos verdes (aproximadamente 100 veces más altos) y los medido para plantas de espinaca WT con hojas verdes con pecíolos rojos y nervadura principales rojas, en donde la coloración roja se limita a los pecíolos y la epidermis por encima de las nervaduras principales (aproximadamente 10 veces más).

Curiosamente, los niveles de clorofila no cambiaron en las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota, en comparación con las espinacas verdes WT y las espinacas con nervaduras roja WT (vea la Tabla 1).

Como los niveles de clorofila fueron bastante similares para todas las diferentes líneas (Squirrel, línea de espinaca de nervadura roja RZ y las tres líneas de plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota) mientras que los niveles de betacianina diferían considerablemente, la relación entre la clorofila total

($\mu\text{g/g}$ de peso fresco) y la betacianina (μg equivalentes de betanina/g de peso fresco) también diferían claramente entre las plantas de la invención que portan el determinante genético de forma homocigota y ambas líneas de espinaca WT (vea Tabla 1).

5 Ejemplo 4

Transferencia del rasgo de la invención a otras plantas de espinaca

10 Las plantas de espinaca que comprenden el determinante genético, que conduce a que la planta tenga una coloración roja de las hojas, en un estado homocigoto, tal como se encuentra en la semilla representativa depositada bajo los números de acceso al depósito NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956 (denominada en la presente descripción donante), se cruzaron con varias plantas de espinaca de tipo silvestre (WT) diferentes que no portan el rasgo de la invención.

15 En los cruces de espinacas, no es raro que ocurra algo de autopolinización. Para permitir una fácil detección de ocurrencias ocasionales de autopolinización, el progenitor donante se usó como polinizador o padre en estos cruces. Si determinadas supuestas plantas F1, cultivadas a partir de las semillas cosechadas de la planta madre WT tienen un fenotipo muy similar al de la madre WT, y las plantas F2 obtenidas por autopolinización de esas supuestas plantas F1 también se parecían a la planta madre WT original, entonces se concluyó que esas plantas resultan de una autopolinización de la planta madre WT, y fueron descartadas.

20 Inesperadamente, las plantas F1 resultantes de este cruce tenían un fenotipo de coloración de hojas que era intermedio entre el fenotipo del progenitor WT y el de las plantas de espinacas que comprenden el determinante genético que conduce a que la planta tenga una coloración roja de las hojas de forma homocigota (progenitor donante). Esto sugiere una herencia semidominante del rasgo de la invención. Estas plantas F1 tenían pecíolos y limbos rojos con nervaduras primarias y secundarias rojas y una coloración rojiza adicional en la superficie adaxial de la hoja en las áreas foliares entre estas nervaduras (vea Figura 2B). Este fue el caso tanto para las plantas F1 resultantes de un cruce en el cual el progenitor WT tenía hojas y pecíolos verdes, y como para las plantas F1 resultantes de un cruce en el cual el progenitor WT tenía hojas verdes con pecíolos rojos y nervaduras principales rojas, en donde la coloración roja se confina a los pecíolos y la epidermis por encima de las nervaduras principales.

La planta de espinaca WT en la cual puede introducirse el rasgo de la invención puede ser una planta de espinaca de cualquier tipo de hoja, cualquier forma o cualquier coloración.

35 Subsecuentemente, estas plantas F1 se autopolinizaron y se obtuvieron plantas F2. Los diferentes F2 se segregaron de una manera que se corresponde con una herencia semidominante monogénica, también llamada dominante incompleta, inherente del rasgo de la invención. El resultado en la F2 fue aproximadamente una planta con la coloración de la hoja del progenitor WT a una planta con la coloración de la hoja roja del progenitor donante a dos plantas con un fenotipo intermedio con hojas verdes con pecíolos rojos y limbos con nervaduras primarias y secundarias rojas y coloración rojiza adicional en la superficie adaxial de la hoja en las áreas de la hoja entre estas nervaduras (vea la Tabla 2 y la Figura 2).

45

50

55

60

65

Tabla 2

Segregaciones del rasgo de la invención en 3 poblaciones F2 de cruces del progenitor donante (padre) con diferentes progenitores de espinaca verde WT (verde), y 3 poblaciones F2 de cruces del progenitor donante (padre) con diferentes plantas progenitoras de espinaca con hojas verdes con pecíolos rojos y nervaduras principales rojas, en donde la coloración roja se confina a los pecíolos y la epidermis por encima de las nervaduras principales (nervadura roja).

cruce		verde	rojizo	rojo	total	chi- Probabilidad cuadrado	p > 0,05?
1	observado	8	14	8	30	0,936	Sí
	esperado	7,5	15	7,5	30		
2	observado	48	125	43	216	0,061	Sí
	esperado	54	108	54	216		
3	observado	57	101	52	210	0,762	Sí
	esperado	52,5	105	52,5	210		
cruce		nervadura roja	rojizo	rojo	total	chi- Probabilidad cuadrado	p > 0,05?
4	observado	7	15	8	30	0,967	Sí
	esperado	7,5	15	7,5	30		
5	observado	48	91	38	177	0,530	Sí
	esperado	44,3	88,5	44,3	177		
6	observado	35	86	34	155	0,391	Sí
	esperado	38,8	77,5	38,8	155		

Las pruebas de chi-cuadrado confirman que el número observado de plantas F2 que tenían el fenotipo progenitor WT (o bien, nervadura verde o roja), el fenotipo progenitor donante (rojo) y el fenotipo intermedio (rojizo) estaban de acuerdo con lo que se espera si un rasgo se segrega de forma semidominante, específicamente, 1:1:2 (fenotipo progenitor WT: fenotipo del progenitor donante: fenotipo intermedio). Los valores de probabilidad de chi-cuadrado están por encima de 0,05 en todas estas poblaciones. De los datos de segregación de la Tabla 2 puede concluirse, por tanto, que el determinante genético de la invención se comporta como un rasgo semidominante monogénico.

REIVINDICACIONES

1. Planta de espinaca (*Spinacia oleracea*) que comprende un determinante genético que conduce a que la planta tenga una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca que se encuentra entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, cuyo determinante genético es como se comprende en una semilla representativa de la planta de espinaca que se depositó en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, en donde el pigmento rojo comprende betacianina y el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.
2. Planta de espinaca como se reivindicó en la reivindicación 1, en donde el determinante genético está presente de forma homocigota.
3. Planta de espinaca como se reivindicó en la reivindicación 1, en donde el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos, en orden de mayor preferencia, 80 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 90 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 100 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 110 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 120 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 130 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 140 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 150 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 160 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 170 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 180 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 190 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 200 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 210 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 220 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 230 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 240 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 250 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 300 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 350 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 400 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 450 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 500 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 550 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco, 600 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.
4. Planta de espinaca como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, obtenible mediante cruzamiento de una primera planta de espinaca con una segunda planta de espinaca, en donde al menos una de dichas plantas comprende el determinante genético como se comprende en una semilla representativa de la planta de espinaca que se depositó bajo los números de acceso de NCIMB, NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, o una planta progenie de la misma que porte el determinante genético, y seleccionar, preferentemente en la generación F2, plantas que tienen una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, en donde el pigmento rojo comprende betacianina, y el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.
5. Semilla de una planta de espinaca como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la semilla comprende el determinante genético presente en las semillas de las cuales se depositó una muestra representativa en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, en donde el determinante genético conduce a que una planta de espinaca cultivada a partir de dicha semilla tenga una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, y en donde el pigmento rojo comprende betacianina, y el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.
6. Planta progenie de una planta de espinaca como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o de semilla de espinaca como se reivindicó en la reivindicación 5, en donde la planta comprende el determinante genético presente en las semillas de las cuales se depositó una muestra representativa en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956, en donde el determinante genético conduce a que la planta progenie tenga una coloración roja de las hojas, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, y en donde el pigmento rojo comprende betacianina, y el contenido de betacianina de las hojas en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.
7. Planta progenie como se reivindicó en la reivindicación 6, en donde el determinante genético está presente de forma homocigota.
8. Material de propagación derivado de una planta como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-7 o la semilla como se reivindicó en la reivindicación 5, en donde el material de propagación comprende el

determinante genético presente en semillas de las cuales se depositó una muestra representativa en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 41954, NCIMB 41955 y NCIMB 41956.

- 5 9. Material de propagación que puede cultivarse como una planta como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 10 10. Material de propagación como se reivindicó en la reivindicación 8 o 9, en donde el material de propagación se selecciona del grupo que consiste en microesporas, polen, ovarios, óvulos, embriones, sacos embrionarios, óvulos, esquejes, raíces, puntas de raíces, hipocótilos, cotiledones, tallos, hojas, flores, anteras, semillas, células meristemáticas, protoplastos, callos y células.
11. Cultivo de tejido del material de propagación como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 8-10.
- 15 12. Una hoja de espinaca de una planta como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-7 que tiene una coloración roja, en donde al menos parte de las células de la epidermis de la hoja de espinaca entre las nervaduras de al menos la superficie adaxial de la hoja, preferentemente tanto la superficie adaxial como la abaxial de la hoja, comprende un pigmento rojo, en donde el pigmento rojo comprende betacianina, y el contenido de betacianina de la hoja en la etapa de cosecha es al menos 70 µg equivalentes de betanina/g de peso fresco.
- 20 13. Una o más plantas de espinaca como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y 6-7 en un sustrato de crecimiento en un contenedor para la cosecha de hojas de la planta de espinaca en un entorno doméstico.

25

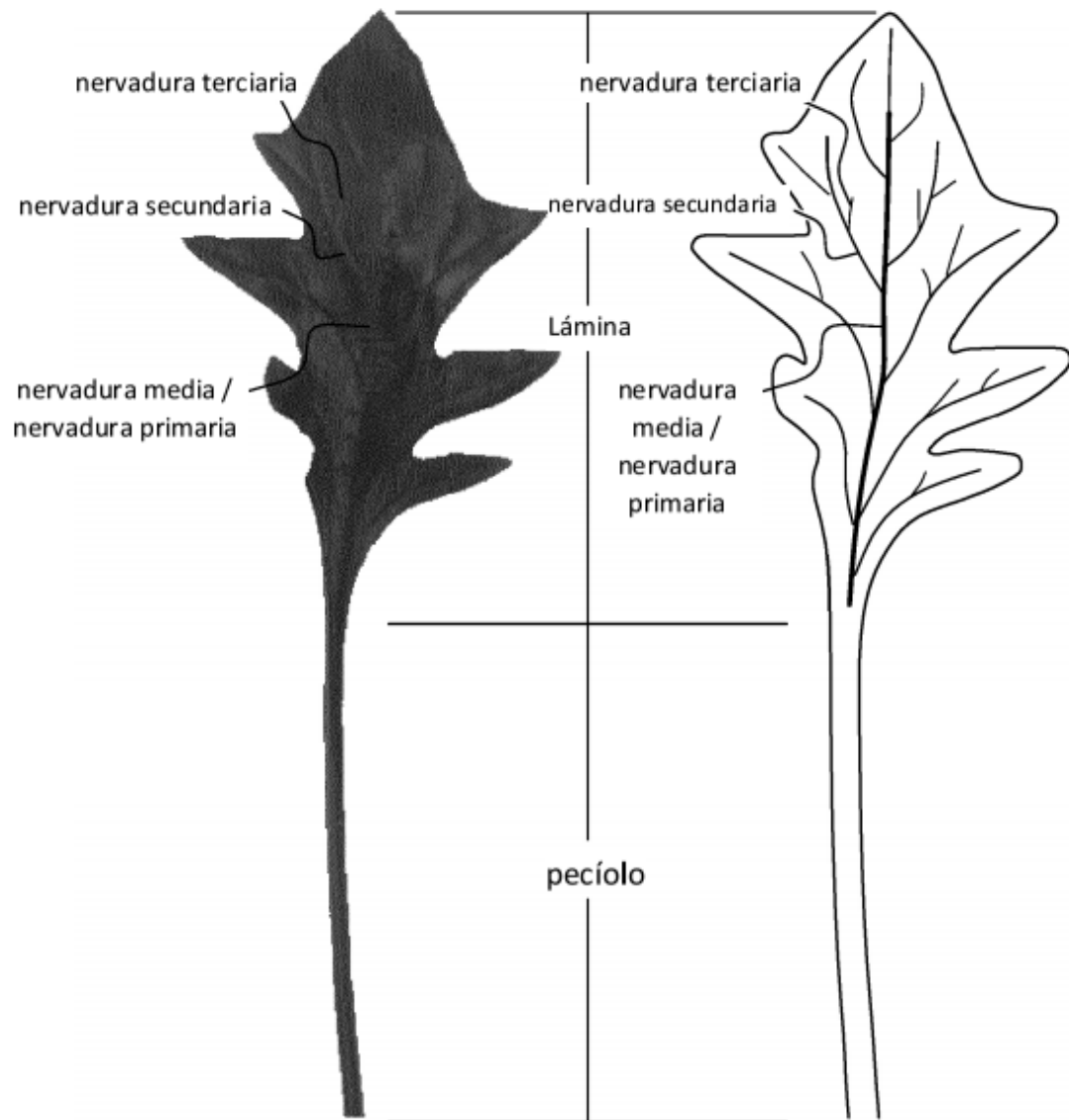


Figura 1

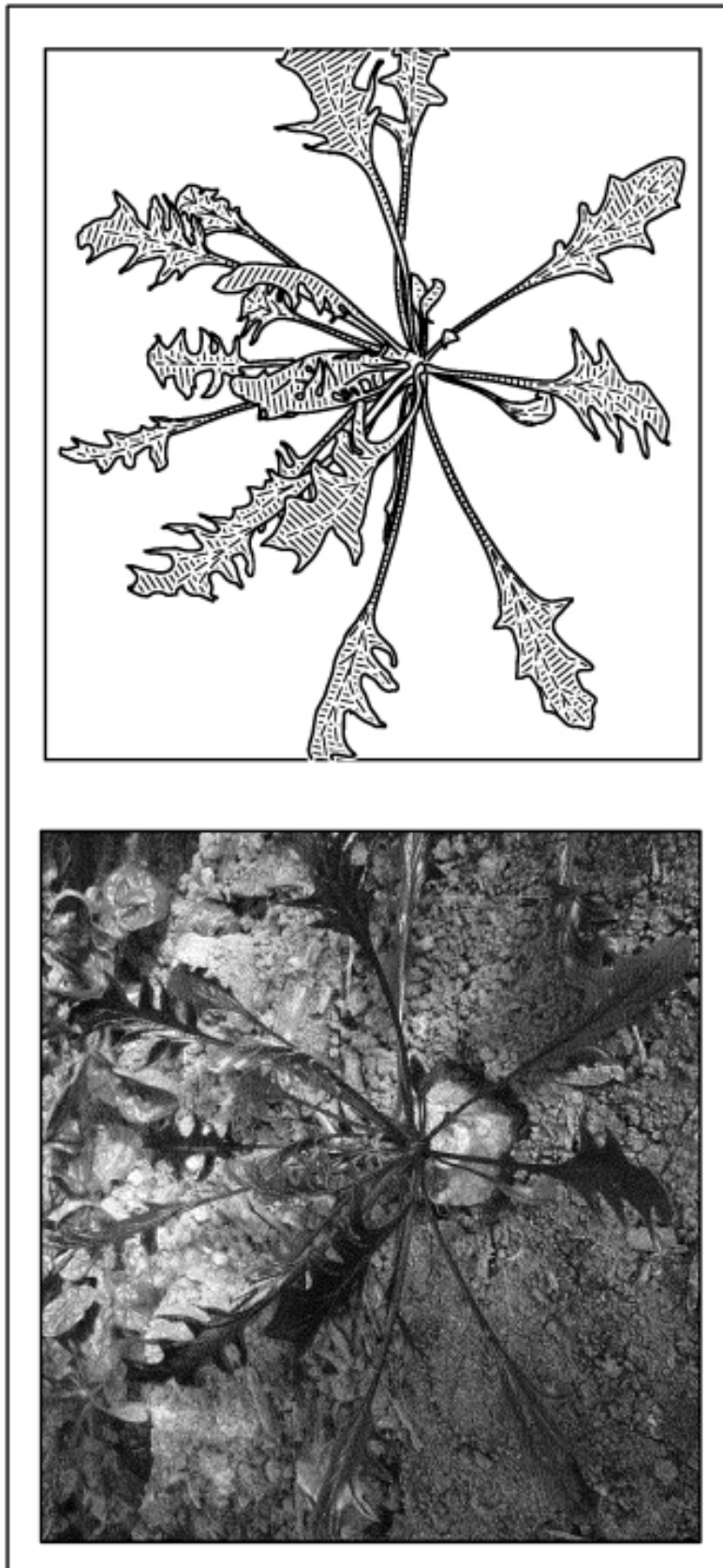


Figura 2A

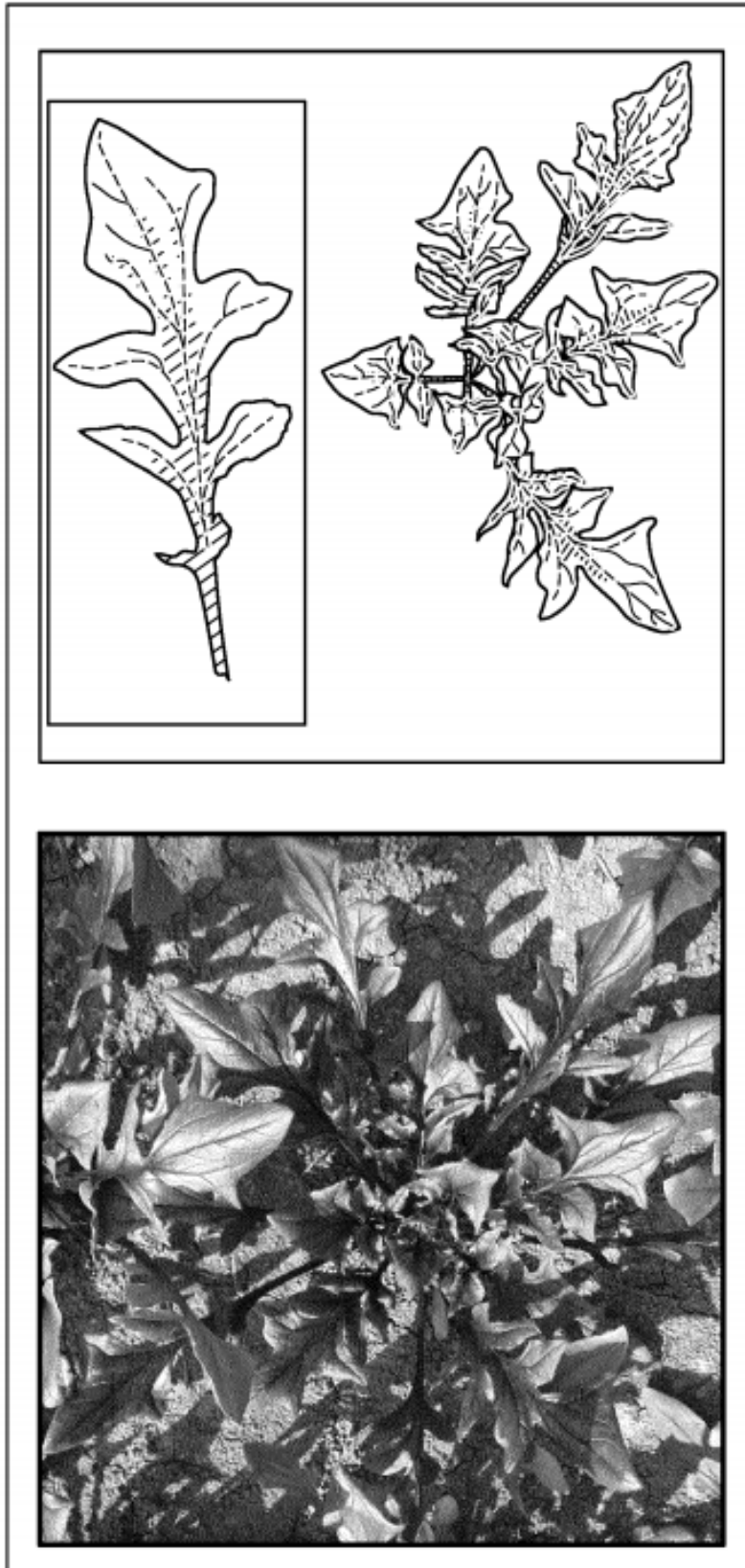


Figura 2B

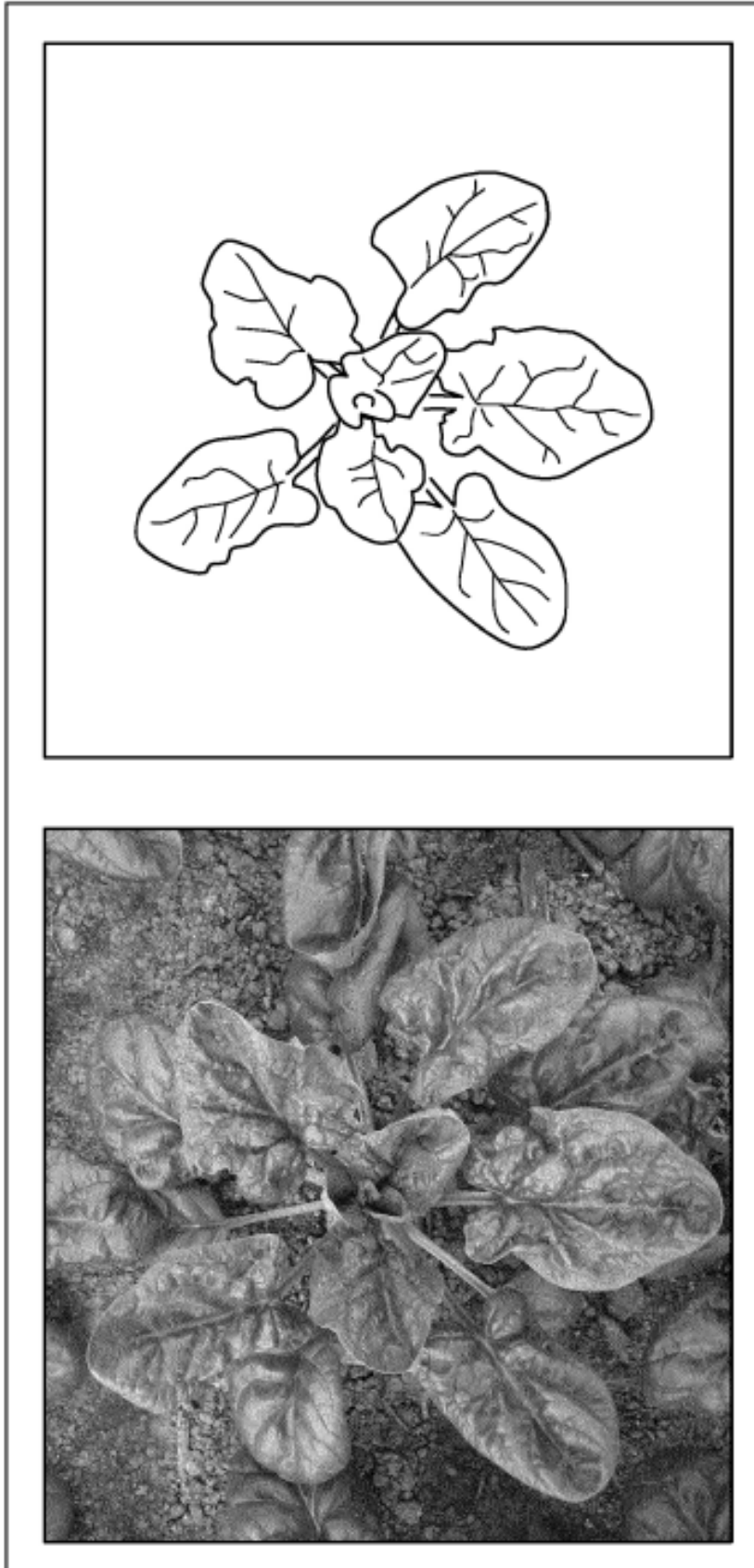


Figura 2C

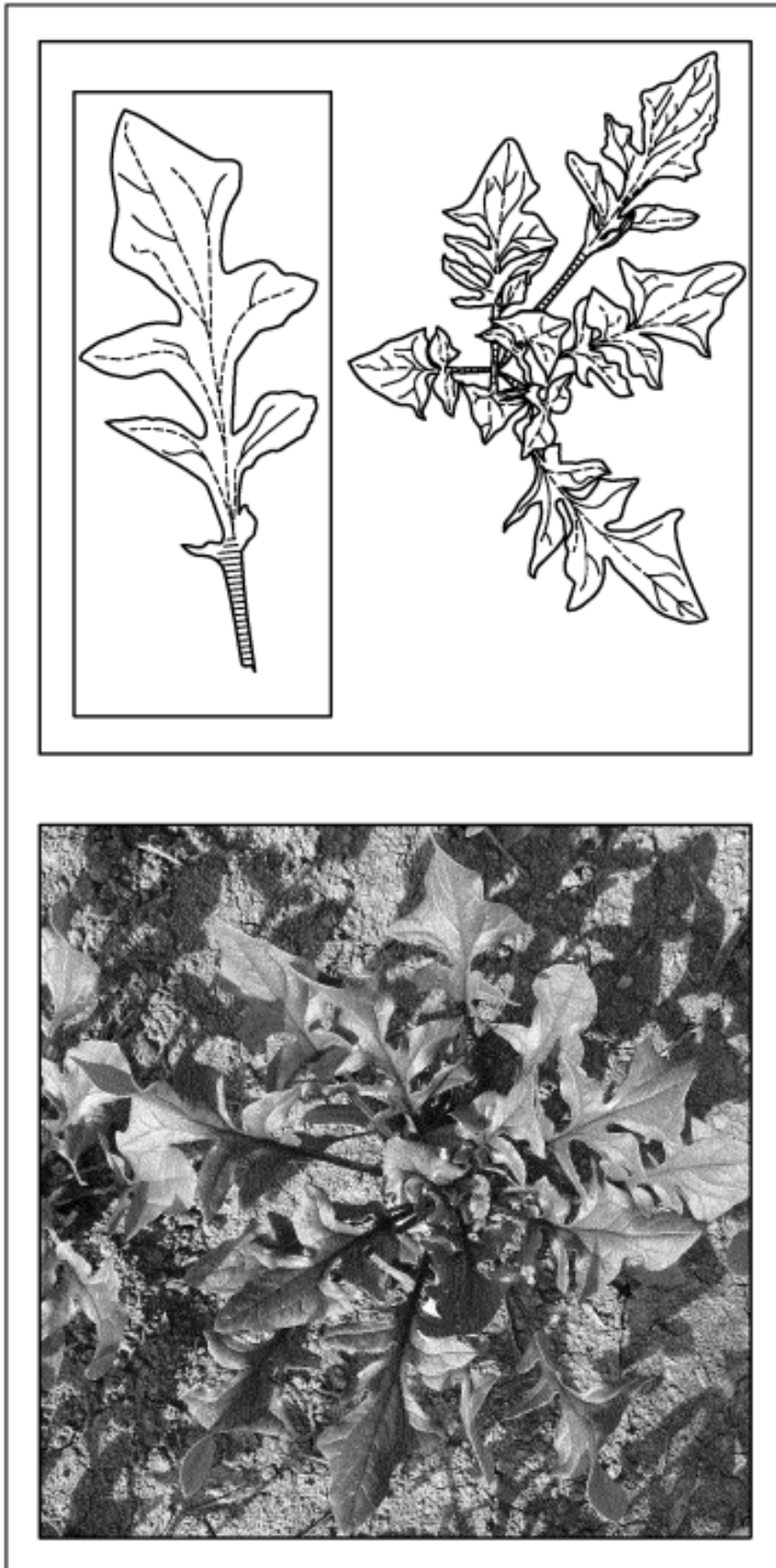


Figura 2D

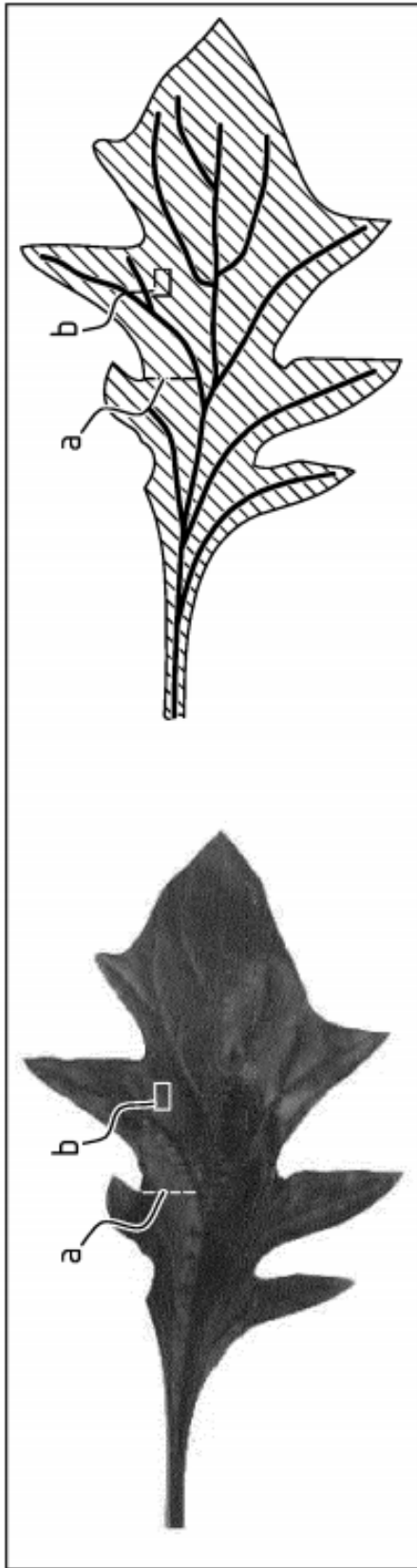


Figura 3A

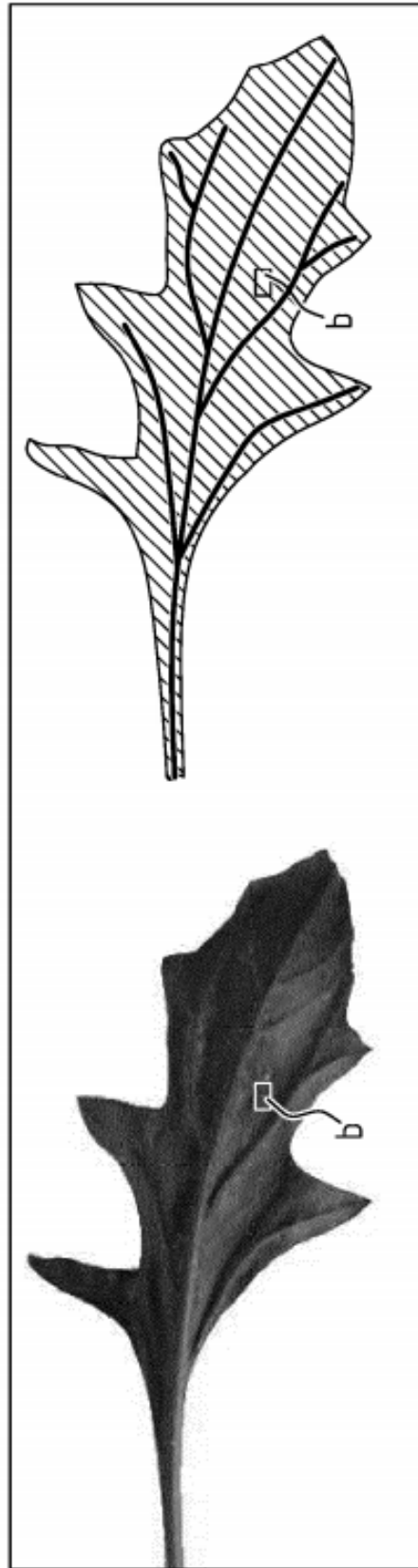


Figura 3B

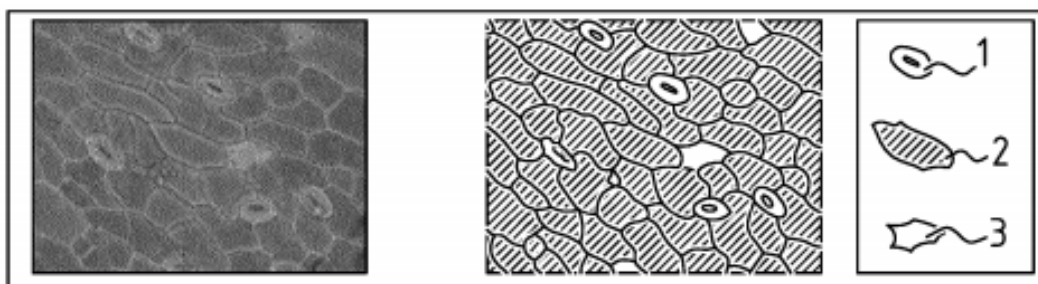


Figura 3C

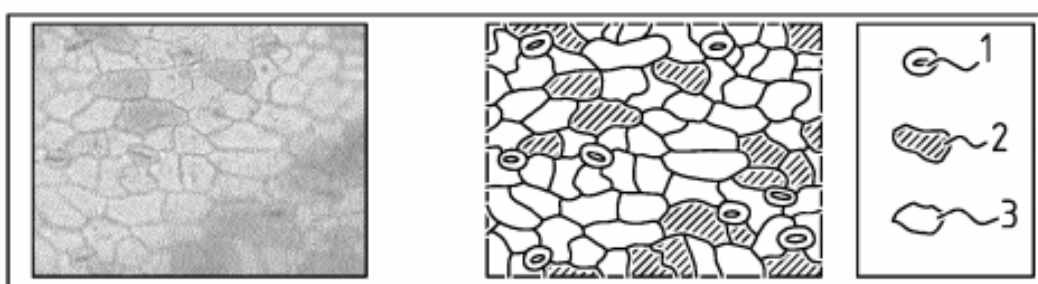


Figura 3D

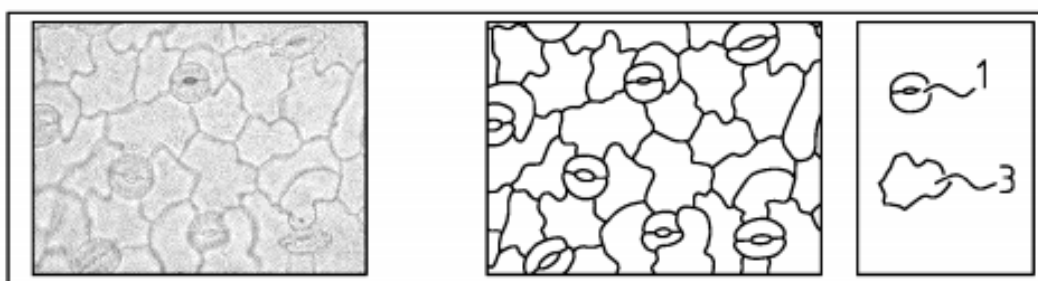


Figura 3E

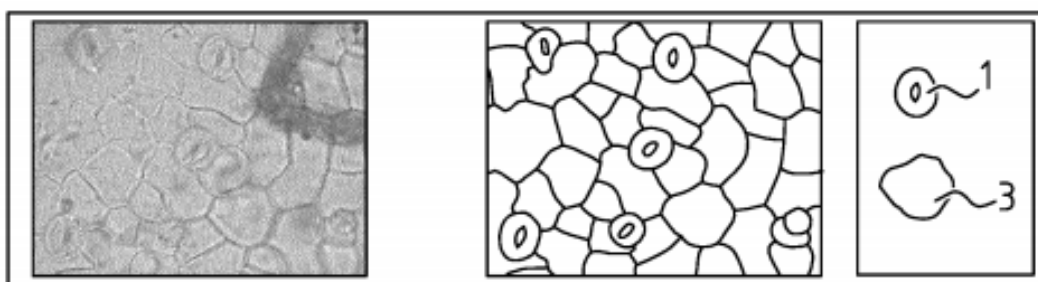


Figura 3F

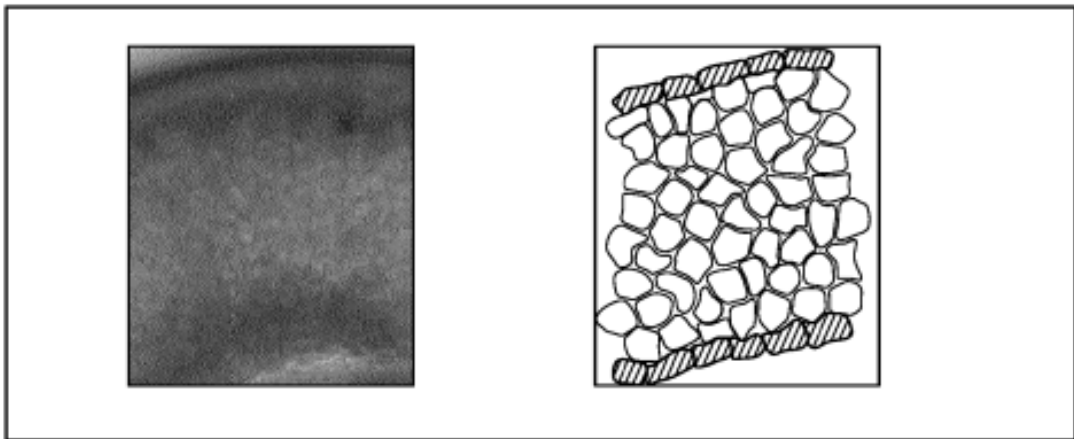


Figura 3G

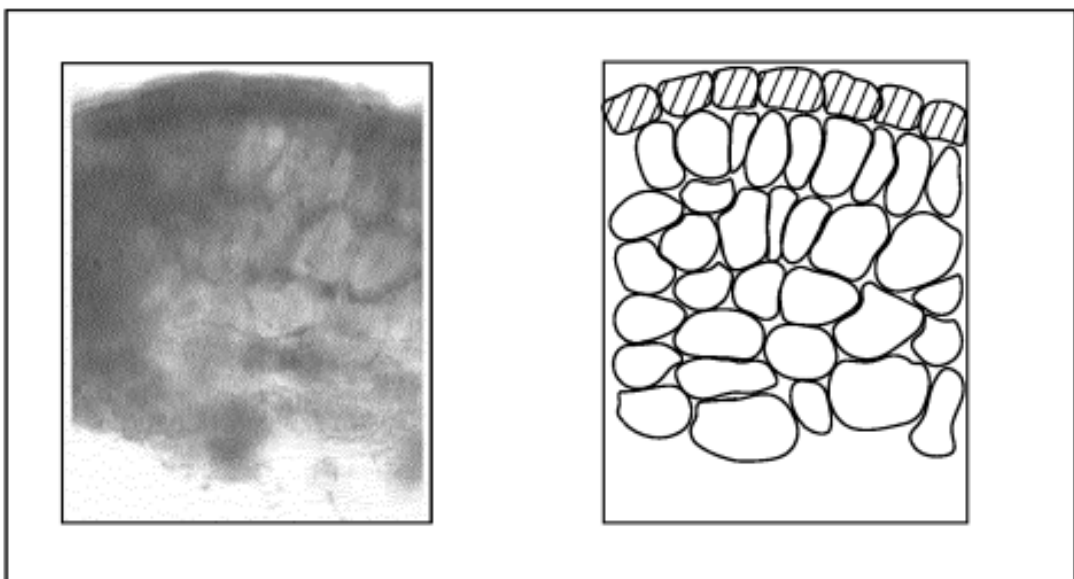


Figura 3H