

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 533**

51 Int. Cl.:
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09004548 .5**
96 Fecha de presentación: **24.01.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **2096172**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **Secuencias genéticas que tienen actividad de metiltransferasa y usos de las mismas**

30 Prioridad:
25.01.2002 AU 2002100174

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.07.2012

73 Titular/es:
Suntory Holdings Limited
1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP

72 Inventor/es:
Brugliera, Filippa;
Demels, Linda y
Tanaka, Yoshikazu

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 385 533 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

Secuencias genéticas que tienen actividad de metiltransferasa y usos de las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se relaciona con una secuencia genética que codifica un polipéptido que tiene actividad metiltransferasa y el uso de la secuencia genética y/o el polipéptido para modificar una o más características fenotípicas de una planta. La metiltransferasa de la presente invención actúa sobre los flavonoides, preferiblemente cuando el flavonoide es una antocianina. Más particularmente, la presente invención se relaciona con un polipéptido que tiene actividad S-adenosil-L-metionina: antocianina 3' -Ometiltransferasa o S-adenosil-L-metionina: antocianina
10 3', 5'-O- metiltransferasa. La presente invención aún se relaciona adicionalmente con una secuencia genética que codifica un polipéptido que tiene actividad metiltransferasa derivada de Petunia. Se describen las moléculas anticodificante y codificante que corresponden a toda o parte de la secuencia genética objeto así como también plantas genéticamente modificadas así como también flores de corte, partes, extractos y tejido reproductivo de tales plantas.

15 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Los detalles bibliográficos de las publicaciones referidas por el autor en esta especificación se recolectan al final de la descripción.

No se hace referencia a cualquier técnica anterior en esta especificación, y no se debe tomar como, un conocimiento o alguna forma de sugerencia de que está técnica anterior forma parte del conocimiento general común en cualquier
20 país.

La industria de las flores o plantas ornamentales se esfuerza por desarrollar nuevas y diferentes variedades de flores y/o plantas. Una forma efectiva de crear tales variedades novedosas es a través de la manipulación del color de la flor. Se han utilizando técnicas de siembra clásicas con cierto éxito para producir una amplia gama de colores para la mayor parte de variedades comerciales de flores y/o plantas disponibles actualmente. Este método se ha limitado,
25 sin embargo, por las restricciones de un grupo de genes de una especie particular y por esta razón es raro para una única especie tener el espectro completo de variedades de color. Por ejemplo, el desarrollo de variedades de color novedosas de plantas o partes de planta tales como flores, follaje y tallos ofrecería una oportunidad significativa en los mercados de flores de corte y ornamentales. En la industria de las flores o de las plantas ornamentales, el desarrollo de variedades de color novedosas de especies de florecimiento principales tales como rosa, crisantemo,
30 tulipán, lirio, clavel, gerbera, orquídea, lisianthus, begonia, torenia, geranio, petunia, nierembergia, geranio pensamiento, balsaminia y violeta de persia serían de gran interés. Un ejemplo más específico sería el desarrollo de una rosa azul o gerbera para el mercado de flores de corte.

Adicionalmente, el desarrollo de variedades de color novedosas de partes de planta tales como vegetales, frutos y semillas ofrecería oportunidades significativas en la agricultura. Por ejemplo, las semillas de color novedosas serían
35 útiles como etiquetas privadas para las plantas. Adicionalmente las modificaciones a los flavonoides comunes para las bayas que incluyen uvas y sus jugos que incluyen vino tienen el potencial para impartir características de valor de estilo alteradas a tales industrias de frutos y subproductos.

El color de la flor se debe predominantemente a tres tipos de pigmentos: flavonoides, carotenoides y betalainas. De los tres, los flavonoides son los más comunes y contribuyen a una gama de colores de amarillo a rojo a azul. Las moléculas de flavonoide que hacen la contribución principal al color de la flor son las antocianinas, que son
40 derivados glucosilados de cianidina y su derivado metilado peonidina, delphinidina y sus derivados metilados petunidina y malvidina y pelargonidina. Las antocianinas se localizan en las vacuolas de las células epidérmicas de los pétalos o las vacuolas de las células subepidérmicas de las hojas.

Los pigmentos de flavonoide son metabolitos secundarios de la ruta fenilpropanoide. La ruta biosintética para los pigmentos de flavonoide (ruta flavonoide) están bien establecidos, (Holton and Cornish, Plant Cell 7: 1071-1083,
45 1995; Mol et al., Trends Plant Sci. 3: 212-217, 1998; Winkel-Shirley, Plant Physiol. 126: 485-493, 2001 a y Winkel-Shirley, Plant Physiol. 127: 1399-1404, 2001b) y se muestran en las Figuras 1A y B. Se involucran tres reacciones y enzimas en la conversión de fenilalanina a p-coumaroil-CoA, uno de los primeros sustratos clave en la ruta de flavonoide. Las enzimas son fenilalanina amoniaco-liasa (PAL), cinnamato 4-hidroxilasa (C4H) y 4-coumarato: ligasa CoA (4CL). La primera etapa comprometida en la ruta implica la condensación de tres moléculas de malonil-CoA (proporcionadas por la acción de acetil CoA carboxilasa (ACC) en acetil CoA y CO₂) con una molécula de p-coumaroil-CoA. Esta reacción se cataliza por la enzima sintasa calcona (CHS). El producto de esta reacción,
50 2',4,4',6', tetrahidroxi-calcona, se isomeriza normalmente rápidamente mediante la enzima calcona flavanona

isomerasa (CHI) para producir naringenina. La naringenina se hidroxila posteriormente en la posición 3 del anillo central mediante flavanona 3-hidroxilasa (F3H) para producir dihidrocamferol (DHK).

5 El anillo B de DHK se puede hidroxilar en las posiciones 3', o las posiciones 3' y 5', para producir dihidroquercetina (DHQ) y dihidromiricetina (DHM), respectivamente. El patrón de hidroxilación del anillo B cumple una función clave en la determinación del color del pétalo, con DHK que conduce de manera general a la producción de los pigmentos basados en pelargonidina rojo ladrillo, el DHQ conduce de manera general a pigmentos con base en cianidina rojo/rosado y DHM que conduce de manera general a pigmentos basados en delphinidina azul/violeta.

10 Los dihidroflavonoles (DHK, DHQ y DHM) también pueden actuar mediante sintasa de flavonol para producir los flavonoles camferol, quercetina y miricetina. Los flavonoles son incoloros pero actúan como copigmentos con las antocianinas para mejorar el color de la flor.

15 La siguiente etapa en la ruta, que conduce a la producción de las antocianinas de color de los dihidroflavonoles, implica dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) con la producción de las leucoantocianidinas. Estas moléculas de flavonoide son inestables bajo condiciones fisiológicas normales y glicosilación en la posición 3, a través de la acción de glicosiltransferasas, estabiliza la molécula de antocinidina permitiendo así la acumulación de antocianinas. En general, las glicosiltransferasas transfieren unas unidades estructurales de azúcar de azúcares UDP y muestran altas especificidades para la posición de glicosilación y relativamente bajas especificidades para los sustratos receptores (Seitz and Hinderer, Anthocyanins. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Constabel, F. y Vasil, I.K. (eds.), Academic Press, New York, USA, 5: 49-76, 1988). Las antocianinas pueden ocurrir como 3-

20 monosidas, 3-biosidas y 3-triosidas así como también 3, 5-diglicosidas y 3, 7-diglicosidas asociadas con los azúcares glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y xilosa (Strack and Wray, In: The Flavonoids - Advances in Research since 1986. Harborne, J.B. (ed), Chapman and Hall, London, UK, 1-22, 1993).

Las glicosiltransferasas implicadas en la estabilización de la molécula de antocianidina incluyen glucosa UDP: 3-glicosiltransferasa flavonoide (3GT), que transfiere una unidad estructural desde la glucosa UDP hasta la posición 3-O de la molécula antocianidina para producir antocianidina 3-O-glucósido.

25 En petunia y pensamiento (entre otros), estas antocianinas luego se pueden glicosilar mediante otra glicosiltransferasa, ramnosa UDP: antocianidina 3-glucósido ramnosiltransferasa (3RT), que agrega un grupo ramnosa a la glucosa ligada 3-O de la molécula antocianina para producir las antocianidina 3-rutinosidas, y una vez aciladas, se pueden modificar adicionalmente mediante UDP: glucosa antocianina 5 glicosiltransferasa (5GT).

30 Muchos glicósidos antocianidina existen en la forma de derivados poliacilados. La acilación puede ser importante para la captación de antocianinas en las vacuolas como se demuestra por Hopp and Seitz (Plant 170: 74-85, 1987). Los grupos acilo que modifican las glicosidas antocianidina se pueden dividir en dos clases principales con base en su estructura. Los grupos acilo alifáticos incluyen ácido malónico o ácido succínico y la clase aromática incluye los ácidos hidroxi cinnámicos tales como ácido p-coumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico y los ácidos benzoicos tales como ácido p-hidroxibenzoico.

35 La acilación de las antocianidina 3-rutinosidas con ácido p-coumárico o ácido cafeico (Griesbach et al., Phytochemistry 30: 1729-1731, 1991) ocurre en *Petunia hybrida*. En otros sistemas de planta, también ocurre la acilación de los flavonoides mediante ácidos alifáticos, tales como ácido malónico, ácido succínico y ácido acético (Goto, Tetrahedron 27: 2413-2416, 1987; Stafford, Flavonoid Metabolism. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA, 1990).

40 La metilación en las posiciones 3' y 3', 5' del anillo B de antocianidina 3-(p-coumaroil) rutinosida-5-glucósidos ocurre en petunia. Se ha demostrado en el extracto libre de células de brotes de la flor de *P. hybrida* que el S-adenosil-L-metionina es el donante metilo y O-metiltransferasa actúa sobre antocianidina 3(p-coumaroil) rutinosida-5-glucósido. Bajo las condiciones utilizadas, no se detecta actividad metilante cuando se utilizan antocianidinas, 3-glucósidos antocianidina, antocianidina 3-rutinosidas, ácido cafeico o ácido p-coumárico como sustratos (Jonsson et al.,

45 Phytochemistry 21 (10): 2457-2460, 1982).

La metilación del anillo B de antocianinas se controla por el locus Mt1, Mt2, Mf1 y Mf2 en petunia (Jonsson et al., Theor. Appl. Genet. 68: 459-466, 1984b). Se han descrito las cuatro enzimas a través de las cuales se codifica cada gen. Estas catalizan la O-metilación 3' y 5' del anillo B. La actividad de metilación 3'5' es más pronunciada con las enzimas codificadas Mf1 y Mf2 (Jonsson et al., 1984b, supra).

50 Se creía que los locus Mt codificaban la actividad S-adenosil-L-metionina:antocianina 3' -O-metiltransferasa (3'FMT) y los locus Mf codificaban S-adenosil-L-metionina:antocianina 3', 5'-O- metiltransferasa (3'5'FMT) y que las enzimas solo metilaban la antocianina 3-(p-coumaroil) rutinosida-5-glucósido. (Jonsson et al., 1982 supra; Jonsson et al., Plant 160: 174-179, 1984a; Jonsson et al., 1984b, supra). Se creía originalmente que los genes Mf1 y Mf2 solo podían expresarse por sí mismos si por lo menos uno de los genes Mt1 o Mt2 se representaba por su alelo

dominante. Sin embargo, los estudios bioquímicos han contradicho estos hallazgos al mostrar que las enzimas son capaces de metilar la delfinidina 3-(p-coumaroil)-rutinosida-5-glucósidos al pigmento malvidina correspondiente en ensayos in vitro (Jonsson et al., Theor. Appl. Genet. 66: 349-355, 1983). Adicionalmente, la acción de Mf1 y Mf2 se restringe a la extremidad de la corola (Wiering, Hort. Genen. Phaenen. 17: 117-134, 1974).

- 5 La presencia de los pigmentos metilados de antocianina se ha reportado en *Petunia* sp. (Sink (ed), *Petunia*, Springer-Verlag, Berlin, 1984; Ando et al., *Biochemical systematics and ecology*, 27: 623-650, 1999), *Plumbago* sp. (inter alia, *Harborne, Phytochemistry*, 6: 1415-1428, 1967; *Harborne, Arch Biochem Biophys*, 96: 171-178, 1962), *Vitis* sp. (Cachio et al., *American J of Ecology and Viticulture*, 43: 244-248, 1992), *Babiana stricta* (Toki et al., *Phytochemistry*, 37: 885-887, 1994), *Pinus* sp. (Andersen, *Biochemical systematics and ecology*, 20: 145-148, 1992),
 10 *Picea* sp., *Larix* sp., *Phaseolus* sp. (Hungria et al., *Plant Physiology*, 97: 751-758, 1991; Takeoka et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3395-3400, 1997), *Solanum* sp. (Lewis et al., *J. of the Science of Food and Agriculture*, 77: 45-57, 1998), *Vaccinium* sp. (Ballington et al., *Can. J. of Plant Sci.*, 68: 241-246, 1988; Skrede et al., *J of Food Science*, 65: 357-364, 2000), *Cyclamen* sp. (Webby and Boase, *Phytochemistry*, 52: 939-941, 1999), *Iris* sp. (Yabuya et al., *Euphytica*, 98: 163-167, 1997; Yabuya and Noda, *Euphytica*, 103: 325-328, 1998), *Pelargonium* sp. (Mitchell et al., *Phytochemistry*, 47: 355-361, 1998; Kobayashi et al., *Breeding Science*, 48: 169-176, 1998),
 15 *Geranium* sp. (Andersen et al., *Phytochemistry*, 38: 1513-1517, 1995), *Pisum* sp. (Crowden, *Phytochemistry*, 21: 2989-2990, 1982), *Lathyrus* sp. (Rat'kin et al., *Zh Obshch Biol*, 41: 685-699, 1980), *Clitoria* sp (Srivastava and Pande, *Planta Med*, 32: 138-140, 1977), *Catharanthus* sp. (Carew and Krueger, *Phytochemistry*, 15: 442, 1976), *Malvia* sp. (Takeda et al., *Phytochemistry*, 28: 499-500, 1989), *Mucuna* sp. (Ishikura and Shibata, *Bot Mag (Tokyo)*, 86: 1-4, 1973), *Vicia* sp. (Catalano et al., *J. Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4568-4570, 1998; Nozzolillo et al., *Canadian Journal of Botany*, 67: 1600-1604, 1989), *Saintpaulia* sp. (Griesbach, *Phytochemistry*, 48: 829-830, 1998),
 20 *Lagerstroemia* sp. (Toki and Katsuyama, *J. Jap Soc Hortic. Sci.*, 63: 853-861, 1995), *Tibouchina* sp. (Francis et al., *J Am Soc Hortic Sci*, 107: 789-791, 1982, Terahara et al., *J. Natural Products*, 56: 335-340, 1993), *Hypocalyptus* sp. (Van Wyk et al., *Biochemical systematics and ecology*, 23: 295-297, 1995), *Rhododendron* sp., *Linum* sp.,
 25 *Macropitilium* sp. (Imrie and Hutton, *J. Hered.*, 69: 54-56 1978), *Hibiscus* sp. (Kim et al., *Phytochemistry*, 28: 1503-1506, 1989; Kim and Fujieda, *J. Kor. Soc. Hortic. Sci.*, 32: 247-255, 1991), *Hydrangea* sp. (Takeda et al., *Phytochemistry*, 29: 1089-1091, 1990), *Ipomoea* sp. (Saito et al., *Phytochemistry* 41: 1607-1611, 1996), *Cymbidium* sp. (Woltering and Somhorst, *J. Plant Physiol.*, 136: 295-299, 1990), *Millettia* sp. (Parvez and Ogbeide, *Phytochemistry*, 29: 2043-2044, 1990), *Hedysarum* sp. (Chriki and Harborne, *Phytochemistry*, 22: 2322-2323, 1983; Chriki, *Agronomie*, 10: 553-540, 1990), *Lespedeza* sp., *Antigonon* sp. (Tiwari and Minocha, *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*, 23: 305-308, 1980) y *Pisum* sp. (Crowden, *Phytochemistry*, 21: 2989-2990, 1982).

Esta lista describe las especies de las que se han reportado los pigmentos antocianina metilados. Sin embargo, se espera que estos pigmentos estén presentes en muchas otras especies.

- 35 Las O-metiltransferasas dependientes de S-adenosil-L-metionina de planta (SAM-OMT) son las enzimas clave en las rutas metabólicas tales como síntesis de fenilpropanoide y flavonoide. Estas enzimas facilitan la transferencia del grupo metilo de S-adenosil-L-metionina (SAM) al grupo hidroxilo de una molécula receptora con la formación de su derivado metil éter y S-adenosil-L-homocisteína como productos. Los mecanismos químicos de las reacciones de transferencia de metilo son idénticos. Sin embargo, los SAM-OMT difieren en su selectividad con respecto a la estereoquímica de las moléculas receptoras metilo, así como también el patrón de sustitución de sus grupos
 40 hidroxilo fenólicos. La metilación de diferentes sustratos se cataliza de manera general mediante SAM-OMT distintos. Sin embargo, algunas enzimas tienen un rango amplio de sustrato aunque usualmente tendrán una preferencia para un sustrato específico o grupo de compuestos.

- 45 Actualmente, existen más de 87 secuencias derivadas de planta que codifican los SAM-OMT en la base de datos GenBank. Prácticamente todas estas secuencias contienen tres motivos consensus altamente conservados (motivos A, B y C) que exhiben una disposición espacial específica (Joshi and Chiang, *Plant Mol. Biol.* 37: 663-674, 1998; Ibrahim and Muzac, In *Recent advances of phytochemistry. Evolution of metabolic pathways.* Elsevier Science Ltd. 34: 349- 385, 2000). Debido a que estos motivos están presentes en la mayor parte de los SAM-OMT de planta independiente de la especificidad de sustrato, se considera que son esenciales para la unión de SAM.

- 50 Al considerar la longitud de la proteína codificada y las relaciones espaciales entre los motivos A y B y los motivos B y C, los SAM-OMT de planta se pueden agrupar en dos clases distintas. El grupo I contiene todos los tres CCoAOMT (caffeoil-CoA SAM-OMT) y exhibe una disposición espacial específica de 19 aminoácidos entre los motivos A y B, y 24 aminoácidos entre los motivos B y C. EL grupo II contiene proteínas con una distancia de 52 residuos entre los motivos A y B y 30 residuos entre B y C. El grupo II de los SAM-OMT incluye los COMT (OMT de ácido cafeico), F3'OMT (3'-OMT de flavonoide) (Gauthier et al., *Plant Mol. Biol.* 32: 1163-1169, 1996), IOMT (OMT de isoflavona) (He and Dixon, *Plant Mol. Biol.* 36: 43-54, 1998), 2'OMT (2'-OMT de isoliquiritigenina) (Maxwell, *Plant J.* 4(6): 971-981, 1993), IMT (OMT de inositol) (Rammesmeier et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 322(1): 183-188, 1995), y F7OMT (7-OMT de flavonoide) (Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* 36: 219-227, 1998), entre otros. Es importante observar en este punto que aquellas enzimas para las que se ha emprendido el análisis de sustrato y para las que se ha asignado una función se prueban usualmente con un rango limitado de sustratos. Las secuencias

de flavonoide SAM-OMT que se han aislado hasta la fecha han estado implicadas en las respuestas de defensa mostrando que no tienen actividad sobre las antocianinas y pertenecen al Grupo II de los SAM-OMT.

Las proteínas CCoAOMT, o Grupo I de los SAM-OMT, varían en longitud entre 231-248 aminoácidos y usualmente requieren cationes divalentes, tales como Mg^{2+} , para actividad catalítica. El grupo II de los SAM-OMT tiene de manera general aproximadamente de 344-383 aminoácidos de longitud y no requiere cationes divalentes. Los dos grupos comparten aproximadamente 20 - 30 % de identidad de aminoácido.

Además de las modificaciones anteriores, el pH y la copigmentación con otros flavonoides tales como flavonoles y flavonas pueden afectar el color del pétalo. Los flavonoles y flavonas también se pueden acilar aromáticamente (Brouillard and Dangles, In: The Flavonoids - Advances in Research since 1986. Harborne, J.B. (ed), Chapman and Hall, London, UK, 1-22, 1993).

La capacidad de controlar la actividad de metiltransferasa flavonoides (denominado aquí adelante como "FMT") específicamente antocianina metiltransferasas proporcionaría unos medios para manipular el color del pétalo permitiendo por lo tanto que una especie única exprese un espectro más amplio de color de las flores. Tal control se puede hacer al modular el nivel de producción de una enzima autóctona o al introducir una enzima no autóctona.

15 RESUMEN DE LA INVENCION

A través de esta especificación, a menos que el contexto lo requiera de otra forma, la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento indicado o entero o grupo de elementos o enteros pero no la exclusión de ningún otro elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

20 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se denominan por un número identificador de secuencia (SEQ ID NO:). La SEQ ID NOs: corresponden numéricamente a los identificadores de secuencia <400>1 (SEQ ID NO: 1), <400>2 (SEQ ID NO: 2), etc. Se proporciona un resumen de los identificadores de secuencia en la Tabla 1. Se proporciona un listado de secuencias después de las reivindicaciones.

25 Se ha determinado que los pigmentos con base en malvidina parecen "más azules" que los pigmentos basados en delphinidina en el fondo mismo del pétalo. Una clase de metiltransferasas que actúa en los flavonoides y en particular las antocianinas se han aislado y encontrado de forma sorprendente por pertenecer al grupo SAM-OMT Clase I del SAM-OMT Clase II como se puede predecir a partir de la literatura. Estas se denominan aquí como flavonoides metiltransferasa (FMT o los FMT). Ejemplos de estas metiltransferasas novedosas incluyen, pero no se limitan a, 3' FMT y 3'5' FMT. Estos FMT novedosos se pueden derivar de muchas especies, por ejemplo, Petunia sp., Torenia sp. Plumbago sp. y Fuchsia sp.

30 Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los FMT descritos aquí se propone que son útiles en la manipulación del color de plantas o partes de planta tales como flores, frutos, nueces, raíces, tallos, hojas y semillas. La modificación genética de las plantas con las moléculas de ácido nucleico descritas aquí permite adicionalmente plantas alteradas en donde los extractos de las mismas son útiles como aditivos de alimento o de sabor o productos saludables que incluyen bebidas o productos de jugo. Tales bebidas incluyen pero no se limitan a vinos, licores, té, café, leche y productos lácteos.

35 Se han identificado y descrito moléculas de ácido de Petunia (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 26), Torenia (SEQ ID NO: 11) y Fuchsia (SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 43). Las secuencias de aminoácidos correspondientes se representan por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 (todas Petunia), SEQ ID NO: 12 (Torenia) y SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 44 (ambas Fuchsia).

Se proporciona un resumen de los identificadores de secuencia utilizados a través de la especificación en la Tabla 1.

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos codificante o complementaria a una secuencia que codifica un flavonoide de metiltransferasa (FMT) en donde dicha secuencia de nucleótidos comprende:

- 45 (i) una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 26;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 70 % de identidad después de alineación óptima con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 26;
- (iii) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de alta rigurosidad para la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 26 o su forma complementaria;

(iv) una secuencia de nucleótidos capaz de codificar la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7;

(v) una secuencia de nucleótidos capaz de codificar una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 70 % de identidad después de alineación óptima con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7;

- 5 (vi) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de alta rigurosidad para la secuencia de nucleótidos en (iv) o (v) o su forma complementaria.

Adicionalmente, una construcción genética que comprende un ácido nucleico de la invención forma otro aspecto de la invención. La invención abarca una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma comprenden una molécula de ácido nucleico no autóctona de la invención en donde dicha planta o parte de la misma o células de la misma es de una especie de flor de corte, una especie horticultural o una especie agrícola, en donde la planta horticultural o agrícola exhibe preferiblemente flores alteradas o inflorescencia, en donde dicha parte modificada es preferiblemente un sépalo, bráctea, peciolo, pedúnculo, ovario, tallo, antera, hoja, raíz, flor, semilla, fruto, nuez, baya o vegetal y/o en donde la planta se selecciona preferiblemente de una rosa, clavel, lisianthus, petunia, lirio, pensamiento, gerbera, crisantemo, Torenia, Begonia, Violeta de persia, Nierembergia, Catharanthus, Geranio pensamiento, Orquídea, uva, Euphorbia o Fuchsia.

Se proporcionan la progenie, descendencia de progenie o estirpes vegetativamente propagadas de una planta genéticamente modificada que comprende un ácido nucleico de la invención, que comprende una molécula de ácido nucleico no autóctona de la invención.

Un método para producir una planta genéticamente modificada capaz de sintetizar FMT o con actividad FMT existente o autóctono reducida, dicho método comprende

(a) para el propósito de producir una planta capaz de sintetizar FMT, transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico bajo condiciones que permiten la expresión eventual de dicha secuencia de ácidos nucleicos, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un periodo y bajo condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos,

(b) para el propósito de producir una planta con actividad FMT existente o autóctono reducida, transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cuando sea necesario cultivar dicha planta transgénica bajo condiciones suficientes para permitir la expresión del ácido nucleico o

(c) para el propósito de producir una planta con actividad FMT existente o autóctono reducida, alterar un FMT que codifica el gen a través de la modificación de las secuencias autóctonas por medio de recombinación homóloga de un ácido nucleico apropiadamente alterado introducido en la célula de planta, y regenerar la planta genéticamente modificada a partir de la célula; se proporciona por la invención en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico de la invención.

Adicionalmente, la invención proporciona un método para producir una planta genéticamente modificada con niveles alterados de FMT codificado en una molécula de ácido nucleico de la invención dicho método comprende introducir en una célula o células de dicha planta una secuencia genética seleccionada de:

(i) una secuencia anticodificante para mARN FMT;

(ii) una secuencia codificante para ADN FMT; y/o

(iii) una secuencia que induce ARNi específica para mARN FMT;

y regenerar una planta genéticamente modificada de dicha célula, en donde la planta exhibe preferiblemente inflorescencia alterada.

Adicionalmente se proporciona un método para producir una planta transgénica capaz de expresar un gen recombinante que codifica un FMT o parte de la misma o que lleva una secuencia de ácidos nucleicos que es sustancialmente complementaria a toda o una parte de una molécula de mARN opcionalmente transcribible cuando se requiere para efectuar la regulación de un FMT, dicho método comprende transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con la molécula de ácido nucleico aislada de la invención cuando sea necesario bajo condiciones que permiten la expresión eventual de dicha molécula de ácido nucleico aislada, y regenerar una planta transgénica a partir de la célula, en donde la planta exhibe preferiblemente inflorescencia alterada.

- 5 También se proporcionan una oligosecuencia de nucleótidos aislada establecida en la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31, un FMT recombinante aislado codificado por una molécula de ácido nucleico de la invención, una molécula de ácido nucleico de FMT recombinante aislado de la invención que comprende una fusión de dos o más secuencias de nucleótidos heterólogas, un organismo procariótico o eucariótico que lleva una secuencia genética que codifica una molécula FMT de la invención extracromosómicamente en forma de plásmido y uso de una molécula de ácido nucleico de la invención en la fabricación de una planta genéticamente modificada en donde la planta genéticamente modificada exhibe flores alteradas o inflorescencia.

TABLA 1

Resumen de los identificadores de secuencia		
ID DE SECUENCIA NO:	NOMBRE	DESCRIPCIÓN
1	Secuencia de petunia difE nt	nucleótido de cADN
2	Secuencia de petunia difE aa	secuencia traducida de cADN
3	'GAGATTT'	Oligonucleótido
4	Secuencia de petunia E20 nt	nucleótido de cADN
5	Petunia E20 aa	secuencia traducida de cADN
6	Petunia E33 nt	nucleótido de cADN
7	Petunia E33 corregido aa	aminoácido de cADN (corregido)
8	1903 F	Oligonucleótido específico FMT
9	1907BamHI	F Oligonucleótido específico FMT
10	1907Pst R	Oligonucleótido específico FMT
11	Torenia TMT5.nt	nucleótido de cADN
12	Torenia TMT5.aa	secuencia traducida de cADN
13	TMT5.BamHI.F	oligonucleótido
14	TMT5.PstI.R	oligonucleótido
15	OMTI f2	Oligonucleótido específico FMT
16	OMTI f4	Oligonucleótido específico FMT
17	OMTI r3	Oligonucleótido específico FMT
18	OMTI r5	Oligonucleótido específico FMT
19	dT(17)Ad2Ad1	oligonucleótido
20	Anclaje GI	oligonucleótido
21	Fuchsia FMT nt	nucleótido de cADN

ES 2 385 533 T3

(continuación)

Resumen de los identificadores de secuencia		
ID DE SECUENCIA NO:	NOMBRE	DESCRIPCIÓN
22	Fuchsia FMT aa	aminoácido de cADN
23	OMT1f1	Oligonucleótido específico FMT
24	OMT1f3	Oligonucleótido específico FMT
25	OMTlr4	Oligonucleótido específico FMT
26	Petunia E33 nt (corregido)	nucleótido de cADN
27	Ad1	oligonucleótido
28	petD8#1	oligonucleótido
29	petD8#2	oligonucleótido
30	PMT-F	Oligonucleótido específico FMT
31	PMT-R	Oligonucleótido específico FMT
32	TMT-F	Oligonucleótido específico FMT
33	TMT-R	Oligonucleótido específico FMT
34	FucR1	Oligonucleótido específico FMT
35	FucR3	Oligonucleótido específico FMT
36	FucR5	Oligonucleótido específico FMT
37	FucR6	Oligonucleótido específico FMT
38	FucF1	Oligonucleótido específico FMT
39	Tor 5' pos	Oligonucleótido específico FMT
40	Tor 5' neg	Oligonucleótido específico FMT
41	Fuchsia FMT (3282).nt	nucleótido de cADN
42	Fuchsia FMT (3282).aa	secuencia traducida de cADN
43	Fuchsia FMT completo (3289).nt	nucleótido de cADN
44	Fuchsia FMT full (3289).aa	secuencia traducida de cADN
45	Ligador BamHI	ligador de oligonucleótido
46	Ligador AscII	ligador de oligonucleótido
47	Ligador Sall	ligador de oligonucleótido

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A y 1B son representaciones esquemáticas de la ruta de biosíntesis para los pigmentos de flavonoide en petunia. Las enzimas implicadas en la ruta se han indicado como sigue: PAL = Amoniaco-liasa fenilalanina; C4H = 4-hidroxilasa Cinnamato; 4CL = 4-coumarato: CoA ligasa; CHS = Sintasa calcona; CHI = Isomerasa de flavanona calcona; F3H = 3-hidroxilasa Flavonona; DFR = 4-reductasa Dihidroflavonol; ANS = Sintasa antocianidina, 3GT= UDP-glucosa: 3-O-glicosiltransferasa flavonoide; 3RT = ramnosa UDP: 3-glucósido ramnosiltransferasa antocianidina, AR-AT = rutinosida aciltransferasa de antocianidina, 5GT = 5-glicosiltransferasa Antocianina; 3' FMT = 3' O-metiltransferasa Flavonoide, 3'5' FMT = 3', 5' O - metiltransferasa Flavonoide. Otras abreviaturas incluyen: DHK = dihidrocamferol, DHQ = dihidroquercetina, DHM = dihidromiricetina, P 3-G = pelargonidin 3- glucósido. Algunos de los locus genéticos que controlan estas reacciones en petunia se muestran en cursiva junto a las enzimas. Los pigmentos basados en miricetina y pelargonidina ocurren raramente en petunia.

La Figura 2 es una representación diagramática del plásmido pCGP 1903 que contiene el clon de cADN difE de P. hybrida cv. V26. Los fragmentos marcados ³²P del fragmento de 0.9 kb de EcoRI/XhoI se utilizan para sondear la colección de cADN de pétalo Old Glory Blue. Las abreviaturas son como sigue: Amp = el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, f1 ori (+) = f1 origen de fago filamentoso de replicación, ColE1ori = origen de plásmido de replicación, rev = ubicación aproximada del sitio de cebador inverso M14 utilizado en el análisis de secuencia, -20 = ubicación aproximada del sitio de cebador M13-20 utilizado en el análisis de secuencia. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 3 es una representación diagramática del plásmido pCGP1907 que contiene el clon de cADN E20 de P. hybrida cv. OGB. Las abreviaturas son como sigue: Amp= el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, f1 ori (+) = f1 origen de fago filamentoso de replicación, ori = origen de plásmido de replicación, rev = ubicación aproximada del sitio de cebador inverso M14 utilizado en el análisis de secuencia, -20 = ubicación aproximada del sitio de cebador M13-20 utilizado en el análisis de secuencia. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 4 es una representación diagramática del plásmido pCGP1908 que contiene el clon de cADN E33 de P. hybrida cv. OGB. Las abreviaturas son como sigue: Amp= el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, f1 ori (+) = f1 origen de fago filamentoso de replicación, ori = origen de plásmido de replicación, rev = ubicación aproximada del sitio de cebador inverso M14 utilizado en el análisis de secuencia, -20 = ubicación aproximada del sitio de cebador M13-20 utilizado en el análisis de secuencia. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 5 es una representación diagramática del plásmido pCGP3086 (mut E20 en pQE30) que contiene el clon de cADN E20 mutado de P. hybrida en el vector de expresión bacteriano pQE30. Las abreviaturas son como sigue: Amp = el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, Col E1 ori = E. coli origen de plásmido de replicación. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 6 es una representación diagramática del plásmido binario pCGP1918. El gen E20 anticodificante quimérico de pCGP1910 se clona dentro del vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación tandem con el gen quimérico SuRB. Las abreviaturas son como sigue: TetR = gen de resistencia a tetraciclina que confiere resistencia a la tetraciclina antibiótica; LB = límite izquierdo; RB = límite derecho; SuRB = la región codificante y la secuencia terminadora del gen de sintasa acetolactato de tabaco; 35S = la región promotora del gen 35S de virus mosaico del coliflor (CaMV), Mac = Promotor híbrido que consiste del promotor del gen mas y una región mejoradora CaMV 35S, mas 3' = la región terminadora del gen sintasa mannopina de Agrobacterium; pVS1 = un origen de rango amplio de anfitrión de replicación de un plásmido de Pseudomonas aeruginosa, pACYC ori = replicón modificado de pACYC184 de E. coli. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 7 es una representación diagramática del plásmido binario pCGP 1919. El gen E33 anticodificante quimérico de pCGP1911 se clona dentro del vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación tandem con el gen quimérico SuRB. Las abreviaturas son como sigue: TetR = el gen de resistencia a tetraciclina que confiere resistencia a la tetraciclina antibiótica; LB = límite izquierdo; RB = límite derecho; SuRB = la región codificante y la secuencia terminadora del gen de sintasa acetolactato de tabaco; 35S = la región promotora del gen CaMV 35S, Mac = Promotor híbrido que consiste del promotor del gen mas y una región mejoradora CaMV 35S, mas 3' = la región terminadora del gen sintasa mannopina de Agrobacterium; pVS1 = un origen amplio de rango de anfitrión de replicación de un plásmido de Pseudomonas aeruginosa, pACYC ori = replicón modificado de pACYC184 de E. coli. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 8 es una representación diagramática del plásmido pTMT5 que contiene el clon de cADN TFMT de Torenia. Las abreviaturas son como sigue: Amp= el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, f1 ori (+) = f1 origen de fago filamentoso de replicación, ori = origen de plásmido de replicación, rev = ubicación aproximada del sitio de cebador inverso M14 utilizado en el análisis de secuencia, -20 =

ubicación aproximada del sitio de cebador M13-20 utilizado en el análisis de secuencia. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 9 es una representación diagramática del plásmido pCGP3090 (mut TFMT en pQE30) que contiene el clon de cADN TFMT mutado de Torenia en el vector de expresión bacteriano pQE30. Las abreviaturas son como sigue: Amp = el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, Col E1 ori = E. coli origen de plásmido de replicación. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 10 es una representación diagramática del plásmido pCGP3097. El clon Torenia FMT (TFMT) de pTMT5 se clona dentro de un casete de expresión CaMV35S. Las abreviaturas son como sigue: Amp= el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, 35S 5' = la región promotora del gen CaMV 35S, 35S 3' = la región terminadora del gen CaMV 35S. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 11 es una representación diagramática del plásmido binario pCGP3099. El gen Torenia FMT quimérico (TFMT) de pCGP3097 (Figura 10) se clona dentro del vector binario pCGP1988 (Figura 12) en una orientación en tandem con el gen quimérico SuRB. Las abreviaturas son como sigue: TetR= el gen de resistencia a tetraciclina que confiere resistencia a la tetraciclina antibiótica; LB = límite izquierdo; RB = límite derecho; SuRB = la región codificante y la secuencia terminadora del gen de sintasa acetolactato de tabaco; 35S 5' = la región promotora del gen CaMV 35S, 35S 3' = la región terminadora del gen CaMV 35S, pVS1 = un origen de rango amplio de anfitrión de replicación de un plásmido de Pseudomonas aeruginosa, pACYC ori = replicón modificado de pACYC184 de E. coli. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 12 es una representación diagramática del plásmido binario pCGP1988. El sitio de multi-clonación del vector binario pWTT2132 (DNAP) se reemplaza con el sitio multi-clonación de pNEB193 (New England Biolabs). Las abreviaturas son como sigue: TetR= el gen de resistencia a tetraciclina que confiere resistencia a la tetraciclina antibiótica; LB = límite izquierdo; RB = límite derecho; SuRB = la región codificante y la secuencia terminadora del gen de sintasa acetolactato de tabaco; 35S 5' = la región promotora del gen CaMV 35S, pVS1 = un origen de rango amplio de anfitrión de replicación de un plásmido de Pseudomonas aeruginosa, pACYC ori = replicón modificado de pACYC184 de E. coli. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 13 es una representación diagramática del plásmido binario pCGP3254. El gen quimérico F3'5'H de pCGP2092 (Figura 14) se clona dentro del plásmido binario pCGP3099 (Figura 11) en una orientación tandem con el gen quimérico SuRB y el gen TFMT quimérico. Las abreviaturas son como sigue: F3'5'H = clon de cADN 3', 5' hidroxilasa flavonoide de Viola, TFMT = Clon de cADN Torenia FMT, TetR = el gen de resistencia a tetraciclina que confiere resistencia a la tetraciclina antibiótica; LB = límite izquierdo; RB = límite derecho; SuRB = la región codificante y la secuencia terminadora del gen de sintasa acetolactato de tabaco; 35S 5' = la región promotora del gen CaMV 35S, 35S 3' = la región terminadora del gen CaMV 35S, pVS1 = un origen de rango amplio de anfitrión de replicación de un plásmido de Pseudomonas aeruginosa, pACYC ori = replicón modificado de pACYC184 de E. coli. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 14 es una representación diagramática del plásmido pCGP2092. El clon Viola F3'5'H de pCGP1961 se clona dentro del un casete de expresión CaMV35S. Las abreviaturas son como sigue: F3'5'H = clon de cADN 3', 5' hidroxilasa flavonoide de Viola, Amp = el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, 35S 5' = la región promotora del gen CaMV 35S, 35S 3' = la región terminadora del gen CaMV 35S. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 15 es una representación diagramática del plásmido binario pSPB1534. El gen Viola F3'5'H quimérico de pSPB580 (Figura 16) se clona en una orientación tandem con el gen quimérico de Petunia FMT y el gen marcador seleccionable del plásmido binario Ti pSPB1531 (Figura 17). Las abreviaturas son como sigue: F3'5'H= clon de cADN 3', 5' hidroxilasa flavonoide de Viola, PFMT = Clon de cADN de Petunia FMT nptIII = el gen fosfotransferasa de neomicina III que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, nptII = el gen fosfotransferasa de neomicina II que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, e35S 5' = una región del promotor mejorado del gen CaMV 35S, petD8 3' = la región terminadora del gen de Petunia PLTP, nos 5' = región promotora del gen de sintasa de nopalina de Agrobacterium, nos 3' = región terminadora del gen de sintasa de nopalina de Agrobacterium, ColE1 = Origen ColE1 del plásmido E. coli, RK2 = origen RK2 de plásmido Gram negativo del rango amplio de anfitrión, LB = límite izquierdo, RB = límite derecho. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 16 es una representación diagramática del plásmido pSPB580. El clon de cADN Viola F3'5'H (BP#40) (de pCGP1961) se clona entre un fragmento de promotor CaMV 35S mejorado (de pBE2113-GUS) y un fragmento terminador de Petunia PLTP (D8) (de pCGP13ΔBam). Las abreviaturas son como sigue: F3'5'H = clon de cADN 3', 5' hidroxilasa flavonoide de Viola, Amp = el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, e35S 5' = una región del promotor mejorado del gen CaMV 35S, ColE1 = Origen ColE1 del plásmido E. coli, petD8 3' = la región terminadora del gen de Petunia PLTP.

La Figura 17 es una representación diagramática del plásmido binario pSPB1531. El clon de cADN de *Petunia* FMT quimérico (PFMT) se amplifica mediante PCR (depCGP1907) (Figura 3) y se reemplaza la región codificante GUS del plásmido binario pSPB176 (Figura 20). Las abreviaturas son como sigue: nptIII = el gen fosfotransferasa de neomicina III que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, nptII = el gen fosfotransferasa de neomicina II que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, e35S 5' = una región del promotor mejorado del gen CaMV 35S, nos 5' = región promotora del gen de sintasa de nopalina de *Agrobacterium*, nos 3' = región terminadora del gen de sintasa de nopalina de *Agrobacterium*, ColE1 = Origen ColE1 del plásmido *E. coli*, RK2 = origen RK2 de plásmido Gram negativo del rango amplio de anfitrión, LB = límite izquierdo, RB = límite derecho. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 18 es una representación diagramática del plásmido binario pSPB1532. El gen *Viola* F3'5'H quimérico de pSPB580 (Figura 16) se clona en una orientación tandem con el gen quimérico de *Petunia* FMT y el gen marcador seleccionable del plásmido binario Ti pSPB1531 (Figura 17). Las abreviaturas son como sigue: F3'5'H = clon de cADN 3', 5' hidroxilasa flavonoide de *Viola*, TFMT = Clon de cADN *Torenia* FMT nptIII = el gen fosfotransferasa de neomicina III que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, nptII = el gen fosfotransferasa de neomicina II que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, e35S 5' = una región del promotor mejorado del gen CaMV 35S, petD8 3' = la región terminadora del gen de *Petunia* PLTP, nos 5' = región promotora del gen de sintasa de nopalina de *Agrobacterium*, nos 3' = región terminadora del gen de sintasa de nopalina de *Agrobacterium*, ColE1 = Origen ColE1 del plásmido *E. coli*, RK2 = origen RK2 de plásmido Gram negativo del rango amplio de anfitrión, LB = límite izquierdo, RB = límite derecho. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 19 es una representación diagramática del plásmido binario pSPB1530. El clon de cADN de *Torenia* FMT quimérico (TFMT) se amplifica mediante PCR (de pTMT5) (Figura 8) y se reemplaza la región codificante GUS del plásmido binario pSPB176 (Figura 20). Las abreviaturas son como sigue: nptIII = el gen fosfotransferasa de neomicina III que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, nptII = el gen fosfotransferasa de neomicina II que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, e35S 5' = una región del promotor mejorado del gen CaMV35S, nos 5' = región promotora del gen de sintasa de nopalina de *Agrobacterium*, nos 3' = región terminadora del gen de sintasa de nopalina de *Agrobacterium*, ColE1 = Origen ColE1 del plásmido *E. coli*, RK2 = origen RK2 de plásmido Gram negativo del rango amplio de anfitrión, LB = límite izquierdo, RB = límite derecho. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 20 es una representación diagramática del plásmido binario pSPB176. Un gen GUS quimérico (de pBE2113- GUS) se clona en una orientación tandem para el gen marcador seleccionable nptII del vector binario Ti pBINPlus. Las abreviaturas son como sigue: nptIII = el gen fosfotransferasa de neomicina III que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, nptII = el gen fosfotransferasa de neomicina II que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, e35S 5' = una región del promotor mejorado del gen CaMV 35S, petD8 3' = la región terminadora del gen de *Petunia* PLTP, nos 5' = región promotora del gen de sintasa de nopalina de *Agrobacterium*, nos 3' = región terminadora del gen de sintasa de nopalina de *Agrobacterium*, ColE1 = Origen ColE1 del plásmido *E. coli*, RK2 = origen RK2 de plásmido Gram negativo del rango amplio de anfitrión, LB = límite izquierdo, RB = límite derecho. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 21 es una representación diagramática del plásmido pCGP3267. Un clon parcial de *Fuchsia* FMT se amplifica utilizando PCR y el cADN de hebra sencilla (preparado de ARN total aislado de pétalos *Fuchsia*) como plantilla y se clona en el plásmido pCR2.1. Las abreviaturas son como sigue: Amp = el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la tetraciclina antibiótica, Kan = el gen de resistencia a canamicina que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, f1 ori (+) = f1 origen de fago filamentoso de replicación, ColE1 ori = origen de plásmido de replicación, rev = ubicación aproximada del sitio de cebador inverso M14 utilizado en el análisis de secuencia, -21 = ubicación aproximada del sitio de cebador M13-21 utilizado en el análisis de secuencia. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 22 es una representación diagramática del plásmido pCGP3289. Una versión de longitud completa de *Fuchsia* FMT (*Fuchsia* FMT completo) se clona dentro del plásmido pCR2.1. Las abreviaturas son como sigue: Amp = el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, Kan = el gen de resistencia a canamicina que confiere resistencia a la canamicina antibiótica, f1 ori (+) = f1 origen de fago filamentoso de replicación, ColE1 ori = origen de plásmido de replicación, rev = ubicación aproximada del sitio de cebador inverso M13 utilizado en el análisis de secuencia, -21 = ubicación aproximada del sitio de cebador M13-21 utilizado en el análisis de secuencia. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 23 es una representación diagramática del plásmido pCGP3290. El clon de cADN *Fuchsia* FMT (FFMT) de pCGP3289 (Figura 22) se clona dentro de un casete de expresión CaMV 35S. Las abreviaturas son como sigue: Amp = Amp = el gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, 35S 5' = la región promotora del gen CaMV 35S, 35S 3' = la región terminadora del gen CaMV 35S. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 24 es una representación diagramática del plásmido binario pCGP2788. El casete de expresión 35S 5': Torenia FMT: 35S 3' se retira del plásmido binario pCGP3254 (Figura 13) para dejar un vector binario con el casete de expresión 35S 5': Viola F3'5'H: 35S 3' en tandem con el gen de marcador seleccionable 35S 5': SuRB. Las abreviaturas son como sigue: F3'5'H = clon de cADN de 3', 5' hidroxilasa flavonoide de Viola, TetR = el gen de resistencia a tetraciclina que confiere resistencia a la tetraciclina antibiótica; LB = límite izquierdo; RB = límite derecho; SuRB = la región codificante y la secuencia terminadora del gen de sintasa acetolactato de tabaco; 35S 5' = la región promotora del gen CaMV 35S, 35S 3' = la región terminadora del gen CaMV 35S, pVS1 = un origen de rango amplio de anfitrión de replicación de un plásmido de Pseudomonas aeruginosa, pACYC ori = replicón modificado de pACYC184 de E. coli. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 25 es una representación diagramática del plásmido binario pCGP3292. El casete de expresión de 35S 5': FFMT: 35S 3' de pCGP3290 (Figura 23) se clona en una orientación tandem a los casetes de expresión 35S 5': SuRB y 35S 5': F3'5' 'H: 35S 3' del plásmido binario Ti pCGP2788 (Figura 24). Las abreviaturas son como sigue: F3'5'H = clon de cADN 3', 5' hidroxilasa flavonoide de Viola, FFMT = Clon de cADN Fuchsia FMT, TetR = el gen de resistencia a tetraciclina que confiere resistencia a la tetraciclina antibiótica; LB = límite izquierdo; RB = límite derecho; SuRB = la región codificante y la secuencia terminadora del gen de sintasa acetolactato de tabaco; 35S 5' = la región promotora del gen CaMV 35S, 35S 3' = la región terminadora del gen CaMV 35S, pVS1 = un origen de rango amplio de anfitrión de replicación de un plásmido de Pseudomonas aeruginosa, pACYC ori = replicón modificado de pACYC184 de E. coli. También se marcan los sitios de enzima de restricción seleccionados.

La Figura 26 muestra un dendograma que ilustra la relación de agrupamiento entre las secuencias de aminoácido deducidas de FMT de petunia (pCGP1907.aa), Torenia (pTMT5.aa) y Fuchsia (pCGP3267.aa) con otras O-metiltransferasas de planta de longitud completa (OMT) de la Clase I y la Clase II encontrada en la base de datos GenBank. Los números de acceso Genbank de cada SAM-OMT en la base de datos se muestran en paréntesis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Se han identificado u clonado una secuencia genética que codifica una metiltransferasa y, más particularmente, una flavonoide metiltransferasa (denominado aquí adelante como "FMT"). La secuencia recombinante permite la modulación de metiltransferasa cuando se une a una molécula de flavonoide. Los sustratos incluyen antocianinas con un grupo hidroxilo unido a la molécula tal como antocianinas basadas en las antocianidinas delfinidina, cianidina y petunidina que incluyen pero no se limitan a 3-glucósido delfinidina, 3-glucósido cianidina, 3-glucósido petunidina, 3,5-glucósido delfinidina, 3,5-diglucósido cianidina, 3, 5-diglucósido petunidina proporcionando por lo tanto un medio para manipular el color del pétalo. De acuerdo con lo anterior, la presente invención se relaciona con la alteración de la actividad FMT en plantas, que abarca los niveles de elevación o reducción (es decir modular) de la actividad FMT existente al introducir una secuencia como se discute aquí. La reducción en los niveles de actividad FMT también se puede denominar como regulación por disminución. Más aún, se describen las plantas y partes reproductivas o vegetativas de las mismas que incluyen flores, semillas, vegetales, hojas, tallos, etc., y más particularmente, plantas transgénicas ornamentales o genéticamente modificadas.

Una "planta transgénica" incluye cualquier planta genéticamente modificada y los términos "transgénico" y "genéticamente modificado" se pueden utilizar intercambiabilmente a través de la especificación objeto.

De acuerdo con lo anterior, se describe aquí una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, o complementaria a una secuencia que codifica FMT o un derivado funcional de la enzima.

Para conveniencia, abreviatura y notación, la referencia aquí a una enzima metilante de flavonoide incluye los FMT que actúan en flavonoides tales como antocianinas, flavonoles y/o flavonas. Preferiblemente, la enzima metilante de flavonoide es FMT. La enzima FMT también se puede considerar que incluye un polipéptido o proteína que tiene actividad FMT o actividad similar a FMT. El último abarca derivados que tienen actividades FMT alteradas.

Por lo tanto, se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, o complementaria a una secuencia que codifica FMT o un mutante funcional, derivado, parte, fragmento, homólogo o análogo de FMT.

Los mutantes, derivados, partes, fragmentos, homólogos y análogos pueden ser o no funcionales.

El término "molécula de ácido nucleico" significa una secuencia genética en condición que ocurre en forma no natural. De manera general, esto significa aislado lejos de su estado natural o sintetizado o derivado en un ambiente que ocurre en forma no natural. Más específicamente, incluye moléculas de ácido nucleico formadas o mantenidas in vitro, que incluyen fragmentos de ADN genómicos de moléculas recombinantes o sintéticas y ácidos nucleicos en combinación con ácido nucleicos heterólogos. También se extiende al ADN genómico o cADN o parte del mismo que codifica FMT o una parte del mismo en orientación inversa con relación a sí mismo o a otro promotor. Esto se

extiende adicionalmente a secuencias que ocurren en forma natural siguiendo por lo menos una purificación parcial con relación a otras secuencias de ácidos nucleicos.

El término "secuencias genéticas" se utiliza aquí en su sentido más general y abarca cualesquier series contiguas de bases de nucleótido especificadas directamente, o por medio de una serie complementaria de bases, una secuencia de aminoácidos en una enzima FMT. Tal secuencia de aminoácidos puede constituir un FMT parcial tal como el establecido en la SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 42 o un FMT de longitud completa tal como se establece en la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 44 o una forma truncada activa del mismo o puede corresponder a una región particular tal como un terminal N, terminal C o la porción interna de la enzima. Una secuencia genética también se puede denominar como una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos e incluye una fusión recombinante de dos o más secuencias.

La secuencia genética también se puede someter al uso de codón modificado para mejorar o de otra forma facilitar la expresión en una célula anfitriona particular.

Se describe una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos o secuencia de nucleótidos complementaria sustancialmente como se establece en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 26 SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 o que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de similitud o capaz de hibridar a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 bajo condiciones de baja rigurosidad.

El porcentaje de similitud alternativo incluye por lo menos aproximadamente 60 % o por lo menos aproximadamente 70 % o por lo menos aproximadamente 80 % o por lo menos aproximadamente 90% o por encima, tal como aproximadamente 95 % o aproximadamente 96 % o aproximadamente 97 % o aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 %.

Así se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos o secuencia de nucleótidos complementara como se establece sustancialmente en la SEQ ID NO: o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de similitud o capaz de hibridar a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 o hebras complementarias bajo condiciones de baja rigurosidad, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que tiene actividad FMT.

Para los propósitos de determinar el nivel de rigurosidad para definir las moléculas de ácido nucleico capaces de hibridar a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 la preferencia aquí a baja rigurosidad incluye y abarca dem por lo menos aproximadamente 0 % a por lo menos aproximadamente 15 % v/v de formamida y de por lo menos aproximadamente 1 M a por lo menos aproximadamente 2 M sal para hibridación, y por lo menos aproximadamente 1 M a por lo menos aproximadamente 2 M sal para condiciones de lavado. De manera general, la baja rigurosidad es de aproximadamente 25-30° C a aproximadamente 42° C. La temperatura se puede alterar y se utilizan temperaturas más altas para reemplazar la formamida y/o para dar condiciones de rigurosidad alternativa. Se pueden aplicar condiciones de rigurosidad alternativa cuando sea necesario, tal como rigurosidad media, que incluye y abarca de por lo menos aproximadamente 16 % v/v a por lo menos aproximadamente 30 % v/v de formamida y de por lo menos aproximadamente 0.5 M a por lo menos aproximadamente 0.9 M sal para hibridación, y por lo menos aproximadamente 0.5 M a por lo menos aproximadamente 0.9 M sal para condiciones de lavado, o alta rigurosidad, que incluye y abarca de por lo menos aproximadamente 31 % v/v a por lo menos aproximadamente 50 % v/v de formamida y de por lo menos aproximadamente 0.01 M a por lo menos aproximadamente 0.15 M sal para hibridación, y por lo menos aproximadamente 0.01 M a por lo menos aproximadamente 0.15 M sal para condiciones de lavado. En general, se lleva a cabo lavado $T_m = 69.3 + 0.41 (G+C) \%$ (Marmur and Dolly, J. Mol. Biol. 5:109, 1962). Sin embargo, el T_m de un ADN dúplex se reduce en 1° C con cada aumento de 1 % en el número de emparejamiento incorrecto de los pares base (Bonner and Laskey, Eur. J. Biochem. 46: 83, 1974). La formamida es opcional en estas condiciones de hibridación. De acuerdo con lo anterior, los niveles de rigurosidad particularmente preferidos se definen como sigue: la baja rigurosidad es regulador 6 x SSC, 1.0 % p/v de SDS a 25-42° C; una rigurosidad moderada es regulador 2 x SSC, 1.0 % p/v de SDS a una temperatura en el rango de 20° C a 65° C; la alta rigurosidad es regulador 0.1 x SSC, 0.1 % p/v de SDS a una temperatura de por lo menos 65° C.

Se describe adicionalmente una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos codificante o complementaria a una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos como se establece sustancialmente en la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 44 o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de similitud.

El término similitud como se utiliza aquí incluye la identidad exacta entre las secuencias comparadas en el nivel de nucleótido o aminoácido. Cuando no existe identidad en el nivel de nucleótido, la similitud incluye las diferencias

entre las secuencias que resultan en diferentes aminoácidos que no obstante se relacionan entre sí en los niveles estructural, funcional, bioquímico y/o conformacional. Cuando no existe identidad en el nivel de aminoácido; la similitud incluye aminoácidos que no obstante se relacionan entre sí en los niveles estructural, funcional, bioquímico y/o conformacional. En una realización particularmente preferida, las comparaciones de nucleótido y secuencia se hacen en el nivel de identidad diferente a la similitud.

Los términos utilizados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "similitud de secuencia", "identidad de secuencia", "porcentaje de similitud de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", "sustancialmente similar" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es por lo menos 12 pero frecuentemente 15 a 18 y frecuentemente por lo menos 25 o por encima, tal como 30 unidades de monómero, inclusive de residuos de nucleótidos y aminoácido, de longitud. Debido a que los dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir solo una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente mediante las secuencias de comparación de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de normalmente 12 residuos contiguos que se comparan con una secuencia de referencia. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir espacios) de aproximadamente 20% o menos cuando se compara con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación se puede conducir mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) o mediante inspección y la mejor alineación (es decir que resulta en el porcentaje de homología mayor sobre la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia BLAST de programas como, por ejemplo, se describe por Altschul et al. (Nucl. Acids Res. 25: 3389, 1997). Se puede encontrar una discusión detallada del análisis de secuencia en la Unidad 19.3 de Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15, 1998).

Los términos "similitud de secuencia" e "identidad de secuencia" como se utiliza aquí se refieren al grado que las secuencias son idénticas o funcionalmente o estructuralmente similares sobre una base de nucleótido por nucleótido o una base de aminoácido por aminoácido sobre una ventana de comparación. Así, un "porcentaje de identidad de secuencia", por ejemplo, se calcula al comparar dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que el ácido nucleico base idéntico (por ejemplo A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas mediante el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicar el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Para los propósitos de la presente invención, "identidad de secuencia" se entenderá que significa el "porcentaje de acoplamiento" calculado por el programa de ordenador DNASIS (Versión 2.5 para windows; disponible del Software Hitachi engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA) utilizando predeterminados estándar como se utiliza en el manual de referencia que acompaña el software. Comentarios similares aplican en relación con la similitud de secuencia.

La secuencia de ácidos nucleicos descrita aquí también abarca oligonucleótidos útiles como sondas genéticas para reacciones de amplificación o como moléculas codificantes o anticodificantes capaces de regular la expresión del gen correspondiente en una planta. Una molécula anticodificante descrita aquí también puede abarcar una construcción genética que comprende el gen de cADN o genómico estructural o parte del mismo en orientación inversa con relación su promotor u otro promotor. Esto también puede abarcar una secuencia genética homóloga. Una molécula codificante o anticodificante también se puede dirigir al terminal o las porciones internas del gen que codifica un polipéptido que tiene actividad FMT o a combinaciones de los anteriores de tal manera que se reduce o elimina la expresión del gen.

En este respecto, se describe un oligonucleótido de 5-50 nucleótidos que tiene similitud o complementariedad sustancial a una parte o región de una molécula con una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 o una forma complementaria del mismo. Similitud o complementariedad sustancial en este contexto significa una similitud hibridizable bajo condiciones de baja rigurosidad, alternativamente y preferiblemente media y alternativamente y más preferiblemente altas para hibridación de oligonucleótido (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989). Tal oligonucleótido es útil, por ejemplo, en la detección de secuencias genéticas FMT de diversas fuentes o para supervisar una secuencia genética introducida en una planta transgénica. El oligonucleótido preferido se dirige a una secuencia genética FMT conservada o una secuencia conservada dentro de un género de planta, especie de planta y/o variedad de planta.

5 El oligonucleótido puede corresponder al extremo 5' o el extremo 3' de la secuencia genética FMT. Para conveniencia, se considera aquí que el extremo 5' define una región sustancialmente entre el codón de inicio del gen estructural a una porción central del gen, y se considera aquí que el extremo 3' define una región sustancialmente entre la porción central del gen y el codón de terminación del gen estructural. Es claro, por lo tanto, que los oligonucleótidos o sondas pueden hibridar en el extremo 5' o el extremo 3' o a una región común para los extremos 5' y 3'.

10 La secuencia de ácidos nucleicos que codifica un FMT o diversos derivados funcionales de la misma se pueden utilizar para reducir el nivel de un FMT endógeno (por ejemplo por medio de co-supresión) u otros procesos de inactivación del gen post transcripcional (PTGS) que incluyen ARNi o alternativamente la secuencia de ácidos nucleicos que codifica esta enzima o diversos derivados o partes de la misma se pueden utilizar en la orientación anticodificante para reducir el nivel del FMT. El uso de hebras codificantes, dobles o hebras parcialmente sencillas tales como construcciones con bucles en horquilla son particularmente útiles para inducir una respuesta PTGS. En una alternativa adicional, se puede utilizar ribozimas para inactivar las secuencias de ácido nucleicos objetivo.

Adicionalmente la inhibición post-transcripcional puede reducir la traducción en el material de polipéptido.

15 La referencia aquí para alterar de la actividad FMT se relaciona con una elevación o reducción en la actividad de hasta 30 % o más preferiblemente de 30-50%, o aún más preferiblemente 50-75 % o todavía más preferiblemente 75% o más por encima o por debajo de los niveles exógenos normales o existentes de actividad. Tal elevación o reducción se puede denominar como la modulación de la actividad de enzima FMT. De manera general, la modulación está en un nivel de transcripción o traducción de las secuencias genéticas FMT.

20 Los ácidos nucleicos descritos aquí pueden ser un ácido ribonucleico o ácido desoxiribonucleicos, moléculas circulares covalentemente cerradas o lineales y de hebra sencilla o doble. La molécula de ácido nucleico puede ser cADN. También se describen otras moléculas de ácido nucleico que hibridan bajo condiciones de baja rigurosidad, preferiblemente bajo condiciones de rigurosidad media y más preferiblemente bajo condiciones de rigurosidad alta con las moléculas de ácido descritas aquí y en particular para la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 o una parte o región de la misma. Se describe una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 o una molécula que tiene por lo menos 40 %, más preferiblemente por lo menos 45 %, aún más preferiblemente por lo menos 55 %, todavía más preferiblemente por lo menos 65 %-70 %, y aún más preferiblemente mayor de 85 % de similitud en el nivel de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos a por lo menos una o más regiones de la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 en donde el ácido nucleico codifica o es complementaria a una secuencia que codifica una enzima que tiene actividad FMT. Sin embargo, cabe notar que las secuencias de nucleótidos o aminoácidos pueden tener similitudes por debajo de los porcentajes dados anteriormente y todavía codifican la actividad FMT. Se describen las moléculas de ácido en la forma de cebadores o sondas de oligonucleótido capaces de hibridar a una porción de las moléculas de ácido contempladas anteriormente nucleico, y en particular aquellas establecidas en la SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 6 y/o SEQ ID NO: 11 y/o SEQ ID NO: 21 y/o SEQ ID NO: 26 y/o SEQ ID NO: 41 y/o SEQ ID NO: 43, bajo condiciones de baja rigurosidad, preferiblemente bajo condiciones de rigurosidad media y más preferiblemente bajo condiciones de rigurosidad alta. La porción puede corresponder al extremo 5' o el extremo 3' del gen. Para conveniencia el extremo 5' se considera aquí para definir una región sustancialmente entre el codón de inicio de la secuencia genética estructural en una porción central del gen, y el extremo 3' se considera aquí para definir una región sustancialmente entre la porción central del gen y el codón de terminación de la secuencia genética estructural. Es claro, por lo tanto, que los oligonucleótidos o sondas pueden hibridar en el extremo 5' o el extremo 3' o en una región común para los extremos 5' y 3'.

El término gen se utiliza en su sentido más amplio e incluye cADN que corresponde a los exones de un gen. De acuerdo con lo anterior, la referencia aquí a un gen incluye:-

- (i) un gen genómico clásico que consiste de las secuencias reguladoras transcripcionales y/o traduccionales y/o una región codificante y/o las secuencias no traducidas (es decir intrones, secuencias no traducidas 5'- y 3'-); o
- 50 (ii) mRNA o cADN que corresponden a la región codificantes (es decir exones) y las secuencias no traducidas 5'- y 3' del gen.

El término "gen" también se utiliza para describir la molécula sintética o las moléculas de fusión que codifican todo o parte de un producto de expresión. En realizaciones particulares, el término "molécula de ácido nucleico" y "gen" se puede utilizar intercambiamente.

5 El ácido nucleico o su forma complementaria pueden codificar la enzima de longitud completa o una parte o derivado del mismo. "Derivado" significa cualesquier sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácido único o múltiple con relación a la enzima que ocurre en forma natural y que retiene la actividad FMT. A este respecto, el ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos que ocurre en forma natural que codifica FMT o puede contener sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de nucleótido únicas o múltiples en dicha secuencia que ocurre en forma natural. El ácido nucleico descrito aquí o su forma complementaria también puede codificar una "parte" del FMT, si es activo o inactivo, y tal molécula de ácido nucleico puede ser útil como una sonda de oligonucleótido, cebador para las reacciones de cadena polimerasa o en diversas técnicas mutagénicas, o para la generación de moléculas anticodificantes.

10 La referencia aquí a una "parte" de una molécula de ácido nucleico, secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, preferiblemente se relaciona con una molécula que contiene por lo menos aproximadamente 10 nucleótidos contiguos o cinco aminoácidos contiguos, según sea apropiado.

15 Los derivados de inserción de aminoácido del FMT descrito aquí incluyen las fusiones del terminal amino y/o carboxilo así como también las inserciones intra-secuencia de único o múltiples aminoácidos. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de inserción son aquellas en las que uno o más residuos de aminoácido se introducen en un sitio predeterminado en la proteína aunque también es posible la inserción aleatoria con detección adecuada del producto resultante. Las variantes de eliminación se caracterizan por la remoción de uno o más aminoácidos de la secuencia. Las variantes de aminoácido de sustitución son aquellas en las que por lo menos un residuo en la secuencia se ha retirado y un residuo diferente se ha insertado en su lugar. Las sustituciones típicas son aquellas
20 hechas de acuerdo con la Tabla 2.

TABLA 2

Residuos adecuados para sustituciones de aminoácido	
RESIDUO ORIGINAL	SUSTITUCIONES DE EJEMPLO
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn; Glu
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile; Val
Phe	Met; Leu; Tyr

(continuación)

Residuos adecuados para sustituciones de aminoácido	
RESIDUO ORIGINAL	SUSTITUCIONES DE EJEMPLO
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu; Met

5 Cuando el FMT se deriva mediante la sustitución de aminoácido, los aminoácidos de manera general se reemplazan por otros aminoácidos que tienen propiedades similares, tales como hidrofobicidad, hidrofiliidad, electronegatividad, cadenas laterales voluminosas y similares. La sustitución de aminoácidos tiene típicamente de residuos únicos. Las inserciones de aminoácido estarán usualmente en el orden de aproximadamente 1-10 residuos de aminoácido y las eliminaciones variarán de aproximadamente 1-20 residuos. Preferiblemente, las eliminaciones o inserciones se hacen en pares adyacentes es decir una eliminación de dos residuos o la inserción de dos residuos.

10 Las variantes de aminoácido denominadas anteriormente se pueden hacer fácilmente utilizando técnicas sintéticas de péptido bien conocidas en la técnica, tal como síntesis de péptido de fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1964) y similares, o mediante manipulaciones de ADN recombinante. Las técnicas para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene la secuencia conocida o la secuencia parcialmente conocida son bien conocidas e incluyen, por ejemplo, mutagenia M13. La manipulación de una secuencia de ADN para producir las proteínas variantes que se manifiestan como variantes de sustitución, inserción o eliminación se describen en forma conveniente, por ejemplo, en Sambrook et al., (1989), supra.

Otros ejemplos de mutantes recombinantes o sintéticos y derivados de la enzima FMT descrita aquí incluyen únicas o múltiples sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de cualquier molécula asociada con la enzima tal como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o polipéptidos.

20 Los términos "análogos" y "derivados" también se extienden a cualquier equivalente químico funcional de FMT y también a cualquier derivado de aminoácido descrito anteriormente. Para conveniencia, la referencia a FMT incluye aquí cualquier mutante funcional, derivado, parte, fragmento, homólogo o análogo del mismo.

25 Las secuencias de ácido nucleico derivadas de *Petunia*, *Torenia* o *Fuchsia* se describen aquí. La invención se relaciona con secuencias de *Petunia*. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará inmediatamente que las secuencias similares se pueden aislar de cualquier número de fuentes tales como otras plantas o ciertos microorganismos. Ejemplos de otras fuentes adecuadas de genes que codifican los FMT incluyen, pero no se limitan a *Petunia* sp., *Plumbago* sp., *Vitis* sp., *Babiana stricta*, *Pinus* sp., *Picea* sp., *Larix* sp., *Phaseolus* sp., *Solanum* sp., *Vaccinium* sp., *Cyclamen* sp., *Iris* sp., *Pelargonium* sp., *Geranium* sp., *Pisum* sp., *Lathyrus* sp., *Clitoria* sp., *Catharanthus* sp., *Malvia* sp., *Mucuna* sp., *Vicia* sp., *Saintpaulia* sp., *Lagerstroemia* sp., *Tibouchina* sp., *Hypocalyptus* sp., *Rhododendron* sp., *Linum* sp., *Macroptilium* sp., *Hibiscus* sp., *Hydrangea* sp., *Ipomoea* sp., *Cymbidium* sp., *Millettia* sp., *Hedysarum* sp., *Lespedeza* sp., *Antigonon* sp., *Pisum* sp., etc.

35 Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica FMT se puede introducir en y se expresa en una planta transgénica en cualquier orientación que proporciona por lo tanto un medio para convertir los sustratos adecuados, si se sintetiza en la célula de planta, finalmente en derivados peonidina, petunidina o malvidina u otros metil-flavonoides, o alternativamente para inhibir tal conversión de metabolitos al reducir o eliminar la actividad FMT existente o endógena. La producción de estas antocianinas u otros flavonoides modificará el color del pétalo y puede contribuir a la producción de un color más azul. La expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta puede ser constitutiva, inducible o desarrollada y también puede ser específico de tejido. La palabra "expresión" se utiliza en su sentido más amplio por incluir la producción de ARN o de ARN y la proteína. Esto también se extiende a la expresión parcial de una molécula de ácido nucleico.

Se describe una construcción genética que comprende una molécula de ácido nucleico codificante o complementaria a una secuencia que codifica un FMT que puede ser capaz de modular o de otra forma facilitar la metilación de una antocianina y/o puede ser una S-adenosil-L-metionina O-metiltransferasa Clase I (SAM-OMT) o puede ser de Petunia, Torenia, Fuchsia, Plumbago o de origen de planta botánicamente relacionada o un mutante, parte, fragmento o porción de la misma o un equivalente funcional y/o estructural u homólogo del mismo.

La construcción genética puede tener una secuencia de nucleótidos que comprende:

(i) una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 41 o SEQ ID NO. 43;

(ii) una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de similitud después de alineación óptima con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 41 o SEQ ID NO. 43;

(iii) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de baja rigurosidad para la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 41 o SEQ ID NO. 43; o su forma complementaria;

(iv) una secuencia de nucleótidos capaz de codificar la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 42 o SEQ ID NO. 44;

(v) una secuencia de nucleótidos capaz de codificar una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 50% de similitud después de alineación óptima con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 42 o SEQ ID NO. 44;

(vi) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de baja rigurosidad a la secuencia de nucleótidos en (iv) o (v) o su forma complementaria;

en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una molécula de FMT o un mutante, parte, fragmento o porción de la misma o un equivalente funcional y/o estructural, homólogo, análogo o derivado del mismo.

Los términos "planta genéticamente modificada" y "planta transgénica" se refieren a cualquier planta o progenie o descendencia posterior de la misma o nueva planta vegetativamente propagada que se llega a transformar después de la introducción de la secuencia novedosa de ácidos nucleicos utilizando técnicas de biología molecular apropiadas. Los dos términos se utilizan intercambiablemente a través de la especificación. La secuencia de ácidos nucleicos se puede derivar de la misma o una especie diferente de planta en la que se transforma. Se contempla que el ácido nucleico puede codificar un polipéptido o ser complementario con una secuencia que codifica un polipéptido o un mutante, derivado, parte, fragmento o porción de la misma. Alternativamente la secuencia de ácidos nucleicos puede ser de la región no codificante de un genoma.

Se puede realizar una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma que comprende el material genético codificante o complementario a una secuencia que codifica un FMT que puede ser capaz de modular o de otra forma facilitar la metilación de una antocianina y/o puede ser una S-adenosil-L-metionina O-metiltransferasa Clase I (SAM-OMT) o puede ser de Petunia, Torenia, Fuchsia, Plumbago o de origen de planta botánicamente relacionada o un mutante, parte, derivado, fragmento o porción de la misma o un equivalente funcional y/o estructural u homólogo o análogo.

La planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma pueden tener una secuencia de nucleótidos que comprende:

(i) una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 41 o SEQ ID NO. 43;

(ii) una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de similitud después de alineación óptima con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 41 o SEQ ID NO. 43;

(iii) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de baja rigurosidad a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 41 o SEQ ID NO. 43; o su forma complementaria;

(iv) una secuencia de nucleótidos capaz de codificar la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 42 o SEQ ID NO. 44;

5 (v) una secuencia de nucleótidos capaz de codificar una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 50% de similitud después de alineación óptima con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 42 o SEQ ID NO. 44;

(vi) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de baja rigurosidad a la secuencia de nucleótidos en (iv) o (v) o su forma complementaria;

en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una molécula FMT o un mutante, parte, fragmento o porción de la misma o un equivalente funcional y/o estructural, homólogo, análogo o derivado del mismo.

10 La planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma que comprende material genético codificante o complementario a una secuencia que codifica un FMT que puede ser capaz de modular o de otra forma facilitar la metilación de una antocianina y/o puede ser una S-adenosil-L-metionina O-metiltransferasa Clase I (SAM-OMT) o puede ser de Petunia, Torenia, Fuchsia, Plumbago o origen de planta botánicamente relacionada o un mutante, parte, derivado, fragmento o porción de la misma o un equivalente funcional y/o estructural u homólogo o
15 análogo, puede ser de una especie de flor de corte, un especie de planta horticultural o una especie de planta agrícola.

La planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma de la especie horticultural o especie agrícola pueden exhibir flores alteradas o inflorescencia.

20 La parte alterada de la planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma de la flor de corte, las especies de planta horticultural o agrícola pueden ser un sépalo, bráctea, peciolo, pedúnculo, ovario, tallo, antera, una hoja, raíz, flor, semilla, fruto, nuez, baya o vegetal.

La planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma de las especies de flores de corte se pueden seleccionar de una rosa, clavel, lisianthus, petunia, lirio, pensamiento, gerbera, crisantemo, Torenia, Begonia, Violeta de persia, Nierembergia, Catharanthus, Geranio pensamiento, Orquídea, uva, Euphorbia o Fuchsia.

25 Se describen flores de corte o separadas de una planta genéticamente modificada que comprende el material genético codificante o complementario a una secuencia que codifica un FMT que puede ser capaz de modular o de otra forma facilitar la metilación de una antocianina y/o puede ser un S-adenosil-L-metionina O-metiltransferasa Clase I (SAM-OMT) o puede ser de Petunia, Torenia, Fuchsia, Plumbago o origen de planta botánicamente relacionada o un mutante, parte, derivado, fragmento o porción de la misma o un equivalente funcional y/o estructural o homólogo o
30 o análogo.

Adicionalmente, se describen la progenie, descendencia de progenie o la vegetación que propaga estirpes de las plantas genéticamente modificadas descritas anteriormente.

Las plantas transgénicas o genéticamente modificadas descritas aquí incluyen la especie horticultural y especie agrícola.

35 El término "especies de planta horticultural" incluye pero no se limita a plantas floriculturales (por ejemplo, flores de corte, plantas que florecen en maceta), plantas ornamentales (por ejemplo, plantas de follaje ornamental) y todas las otras formas de horticultura (tales como, semilleros de plantas, plantas en maceta, plantas de jardín).

40 El término "especies de planta agrícola" incluye pero no se limita a grandes cultivos de alimentos y cultivos no alimenticios (por ejemplo, trigo, maíz, algodón, maíz, pastos), fruto, cultivos de nuez y vegetales (por ejemplo manzanas, naranjas, bananas, almendras, nueces, macadamias, zanahorias, guisantes, papas, berenjenas, uvas, tomates) y viticultura.

Según los conocimientos actuales existirá cierta superposición entre las especies de planta hortícola y agrícola.

45 Se describe un método para producir una planta transgénica, tal como pero no limitado a planta de florecimiento transgénico, capaz de sintetizar FMT, dicho método comprende transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho FMT bajo condiciones que permiten la expresión eventual de dicha secuencia de ácidos nucleicos, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un periodo y bajo condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La planta transgénica puede producir por lo tanto FMT no autóctono en niveles elevados con relación a la cantidad expresada en una planta no transgénica
50 comparable.

Adicionalmente se describe un método para producir una planta transgénica con actividad FMT existente o autóctona reducida, dicho método comprende transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos codificante o complementaria a una secuencia que codifica una actividad FMT, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cuando sea necesario cultivar dicha planta transgénica bajo condiciones suficientes para permitir la expresión del ácido nucleico.

También se describe un método para producir una planta genéticamente modificada con actividad FMT existente o autóctona reducida, dicho método comprende alterar el gen FMT a través de la modificación de las secuencias autóctonas por medio de recombinación homóloga de un gen FMT apropiadamente activado o derivado o parte de las mismas introducidas en la célula de planta, y regenerar la planta genéticamente modificada a partir de la célula.

Se describe un método para producir una planta genéticamente modificada con niveles alterados de FMT codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos codificante o complementaria a una secuencia que codifica un FMT que puede ser capaz de modular o de otra forma facilitar la metilación de una antocianina y/o puede ser una S-adenosil-L-metionina O-metiltransferasa Clase I (SAM-OMT) o puede ser de Petunia, Torenia, Fuchsia, Plumbago o origen de planta botánicamente relacionada, dicho método comprende introducir en una célula o células de dicha planta una secuencia genética seleccionada de:

(i) una secuencia anticodificante para mRNA FMT;

(ii) una secuencia codificante para ADN FMT; y/o

(iii) una secuencia que induce ARNi específica para mRNA FMT;

y regenerar una planta genéticamente modificada de dicha célula.

Como se utiliza aquí una enzima "autóctona" es una, que es natural para o que se expresa en forma natural en una célula particular. Una enzima "no autóctona" es una enzima no natural para la célula pero se expresa a través de la introducción del material genético en una célula de planta; por ejemplo, a través de un transgen. Una enzima "endógena" es una enzima producida por una célula pero que puede o no puede ser autóctona para la célula.

Se describe adicionalmente un método para producir una planta transgénica, tal como pero no limitado a una planta de florecimiento transgénico, que exhibe propiedades de inflorescencia alterada, dicho método comprende transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con una secuencia de ácidos nucleicos descrita aquí, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un periodo y bajo condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en un FMT. Alternativamente, dicho método puede comprender transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con una secuencia de ácidos nucleicos descrita aquí o su secuencia complementaria, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un periodo y bajo condiciones suficientes para alterar el nivel de actividad del FMT autóctono o existente. Preferiblemente el nivel alterado sería menor que el nivel autóctono o existente de actividad FMT en una planta no transgénica comparable. Sin esperar limitar la presente invención, una teoría del modo de acción es que la reducción de la actividad FMT autóctona requiere la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos introducida o su secuencia complementaria. Sin embargo, la expresión de la secuencia genética introducida o su complemento no se puede requerir para lograr el efecto deseado: a saber, una planta florecida que exhibe propiedades de inflorescencia alterada.

El término "inflorescencia" como se utiliza aquí se refiere a la parte florecida de una planta. Como se indicó anteriormente, la referencia a una "planta transgénica" también se puede leer como "planta genéticamente modificada".

También se describe un método para producir una planta tal como pero no limitado a planta de florecimiento transgénico que exhibe propiedades de inflorescencia alterada, dicho método comprende la alteración del gen FMT a través de la modificación de las secuencias autóctonas por medio de recombinación homóloga de un FMT apropiadamente alterado o derivado o parte de las mismas introducidas en la célula de planta, y regenerar la planta genéticamente modificada a partir de la célula. Preferiblemente, la inflorescencia alterada incluye la producción de diferentes tonos de flores rojas o azules u otros colores, dependiendo del genotipo y las condiciones fisiológicas de la planta receptora.

Adicionalmente se describe un método para producir una planta transgénica capaz de expresar un gen recombinante que codifica un FMT o parte de la misma o que lleva una secuencia de ácidos nucleicos que es sustancialmente complementaria a toda o una parte de una molécula de mRNA opcionalmente transcribible cuando se requiere para efectuar la regulación de un FMT; dicho método comprende transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con la molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, o complementaria a una secuencia que codifica, un FMT, cuando sea necesario bajo

condiciones que permiten la expresión eventual de dicha molécula de ácido nucleico aislada, y regenerar, una planta transgénica a partir de la célula. "Planta adecuada" significa una planta capaz de producir 3-glucósidos antocianidina y poseer las propiedades fisiológicas apropiadas requeridas para el desarrollo del color deseado. Ejemplos de plantas adecuadas incluyen pero no se limitan a Torenia, Begonia, Violeta de persia, Nierembergia, Catharanthus, Pelargonium, Orchid, uva, Euphorbia o Fuchsia.

Un experto en la técnica reconocerá inmediatamente las variaciones que se pueden aplicar a los métodos descritos aquí, tal como aumentar o reducir la expresión de la enzima presente en forma natural en una planta objetivo que conduce a diferentes tonos de colores tales como diferentes tonos de azul, púrpura o rojo.

Se pueden producir plantas transgénicas o partes de plantas transgénicas o progenie de las plantas transgénicas que contienen toda o parte de la secuencia de ácidos nucleicos descrita aquí, o las formas anticodificantes de la misma y/o cualesquier homólogos o formas relacionadas de la misma y, en particular, aquellas plantas transgénicas que exhiben propiedades de inflorescencia alterada. Las plantas transgénicas puede contener una molécula de ácido nucleico introducida que comprende una secuencia de nucleótidos codificante o complementaria a una secuencia que codifica un FMT. De manera general, el ácido nucleico se introduciría en forma estable dentro del genoma de la planta, aunque se puede introducir una secuencia de nucleótidos FMT dentro de una secuencia de ácidos nucleicos automáticamente replicante tal como un virus de ADN o ARN capaz de replicar dentro de la célula de planta. Se describen las semillas de tales plantas transgénicas. Tales semillas, especialmente si son de color, son útiles como etiquetas propietarias para las plantas.

Las plantas transgénicas adicionales o partes de plantas transgénicas o progenie de las plantas transgénicas que contienen todo o parte de la secuencia de ácidos nucleicos descrita aquí, o las formas anticodificantes de la misma y/o cualesquier homólogos o formas relacionadas de las mismas y, en particular, se pueden producir aquellas plantas transgénicas que exhiben partes aéreas alteradas de la planta tal como sépalo, bráctea, peciolo, pedúnculo, ovarios, anteras o tallo.

Se puede desarrollar un extracto de una planta o parte de planta que comprende el material genético codificante o complementario a una secuencia que codifica un FMT que puede ser capaz de modular o de otra forma facilitar la metilación de una antocianina y/o puede ser una S-adenosil-L-metionina O-metiltransferasa Clase I (SAM-OMT) o puede ser de Petunia, Torenia, Fuchsia, Plumbago o origen de planta botánicamente relacionada o un mutante, parte, derivado, fragmento o porción de la misma o un equivalente funcional y/o estructural o homólogo o análogo.

El extracto puede ser un aditivo de sabor o de alimento o producto saludable o bebida o jugo o color.

Se describe el uso de los extractos de plantas transgénicas o partes de planta de plantas transgénicas o progenie de las plantas transgénicas que contiene toda o parte de la secuencia de ácidos nucleicos descrita aquí y, en particular, los extractos de aquellas plantas transgénicas cuando se utiliza como un aditivo de alimento o de sabor o producto saludable o bebida o jugo o color.

Las partes de planta descritas incluyen flores, frutos, nueces, raíces, tallos, hojas o semillas.

Los extractos descritos se pueden derivar de las plantas o partes de planta en un número de diferentes formas que incluye extracción química o extracción por calor o filtración o exprimido o pulverización.

La planta, parte de planta o extracto se puede utilizar en cualquier número de diferentes formas tales como para la producción de un saborizante (por ejemplo una esencia de alimento), un aditivo de alimento (por ejemplo un estabilizante, un colorante) un producto saludable (por ejemplo un antioxidante, un comprimido) una bebida (por ejemplo vino, licores, té) o un jugo (por ejemplo jugo de frutas) o color (por ejemplo color para alimento, colorante de tela, tinte, pintura).

Se describe un oligonucleótido aislado de por lo menos 5 nucleótidos tiene similitud o complementariedad sustancial en una parte o región de una molécula con una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 o que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de similitud o capaz de hibridar a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 bajo condiciones de baja rigurosidad, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que tiene actividad FMT.

Se describe una oligosecuencia de nucleótidos aislada establecida en la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33 o

SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 40.

5 También se describen las formas recombinantes de FMT. Las formas recombinantes de la enzima proporcionarán una fuente de material para la investigación del desarrollo, por ejemplo, enzimas más activas y pueden ser útiles en desarrollar sistemas in vitro para la producción de compuestos de color.

Se describe una molécula de ácido nucleico de FMT recombinante aislado como se describió anteriormente que comprende una fusión de dos o más secuencias de nucleótidos heterólogas.

Las secuencias genéticas descritas aquí se pueden utilizar en la fabricación de una construcción genética capaz de expresar un FMT o regular por disminución una enzima FMT autóctona en una planta.

10 Se puede producir un organismo procariótico o eucariótico que lleva una secuencia genética que codifica un FMT extracromosómicamente en forma de plásmido.

15 Adicionalmente se describe un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece sustancialmente en la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43 o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de similitud a la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43 o un derivado de dicho polipéptido.

20 Un "polipéptido recombinante" significa un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos introducido en una célula directamente o indirectamente por la intervención humana o en un progenitor u otro precursor relativo o precursor de la célula. También se puede hacer un polipéptido recombinante utilizando sistemas de transcripción in vitro libres de célula. El término "polipéptido recombinante" incluye un polipéptido aislado o cuando está presente una célula o preparación de célula. Este también puede ser una planta o partes de una planta regenerada de una célula que produce dicho polipéptido.

Un "polipéptido" incluye un péptido o proteína y se abarca el término "enzima".

25 El polipéptido recombinante también puede ser una molécula de fusión que comprende dos o más secuencias de aminoácido heterólogas.

Por lo tanto la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos codificante o complementaria a una secuencia que codifica un metiltransferasa flavonoide (FMT) en donde dicha secuencia de nucleótidos comprende:

(i) una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 26;

30 (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 70 % de identidad después de alineación óptima con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 26;

(iii) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de alta rigurosidad para la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 26 o su forma complementaria;

35 (iv) una secuencia de nucleótidos capaz de codificar la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7;

(v) una secuencia de nucleótidos capaz de codificar una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 70 % de identidad después de alineación óptima con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7;

(vi) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de alta rigurosidad para la secuencia de nucleótidos en (iv) o (v) o su forma complementaria.

40 Adicionalmente, una construcción genética que comprende un ácido nucleico de la invención forma otro aspecto de la invención. Una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma comprende una molécula de ácido nucleico no autóctona de la invención en donde dicha planta o parte de la misma o células de la misma es de una especie de flor de corte, una especie hortícola o una especie agrícola, en donde la planta hortícola o agrícola exhibe preferiblemente flores alteradas o inflorescencia, en donde dicha parte modificada es
45 preferiblemente un sépalo, bráctea, peciolo, pedúnculo, ovario, tallo, antera, hoja, raíz, flor, semilla, fruto, nuez, baya o vegetal y/o en donde la planta se selecciona preferiblemente de una rosa, clavel, lisianthus, petunia, lirio,

pensamiento, gerbera, crisantemo, Torenia, Begonia, Violeta de persia, Nierembergia, Catharanthus, Geranio pensamiento, Orquídea, uva, Euphorbia o Fuchsia se abarca por la invención.

5 Se proporcionan la progenie, descendencia de progenie o estirpes vegetativamente propagadas de una planta genéticamente modificada que comprende un ácido nucleico de la invención, que comprende una molécula de ácido nucleico no autóctona de la invención.

Un método para producir una planta genéticamente modificada capaz de sintetizar FMT o con actividad FMT existente o autóctono reducida, dicho método comprende

10 (a) para el propósito de producir una planta capaz de sintetizar FMT, transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico bajo condiciones que permiten la expresión eventual de dicha secuencia de ácidos nucleicos, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un periodo y bajo condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos,

15 (b) para el propósito de producir una planta con actividad FMT existente o autóctono reducida, transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cuando sea necesario cultivar dicha planta transgénica bajo condiciones suficientes para permitir la expresión del ácido nucleico o

20 (c) para el propósito de producir una planta con actividad FMT existente o autóctono reducida, alterar un FMT que codifica el gen a través de la modificación de las secuencias autóctonas por medio de recombinación homóloga de un ácido nucleico apropiadamente alterado introducido en la célula de planta, y regenerar la planta genéticamente modificada a partir de la célula;

se proporciona por la invención cuando el ácido nucleico es un ácido nucleico de la invención.

Adicionalmente, la invención proporciona un método para producir una planta genéticamente modificada con niveles alterados de FMT codificado en una molécula de ácido nucleico de la invención dicho método comprende introducir en una célula o células de dicha planta una secuencia genética seleccionada de:

25 (i) una secuencia anticodificante para mRNA FMT;

(ii) una secuencia codificante para ADN FMT; y/o

(iii) una secuencia que induce ARNi específica para mRNA FMT;

y regenerar una planta genéticamente modificada de dicha célula, en donde la planta exhibe preferiblemente inflorescencia alterada.

30 Adicionalmente se proporciona un método para producir una planta transgénica capaz de expresar un gen recombinante que codifica un FMT o parte de la misma o que lleva una secuencia de ácidos nucleicos que es sustancialmente complementaria a toda o una parte de una molécula de mRNA opcionalmente transcribible cuando se requiere para efectuar la regulación de un FMT, dicho método comprende transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con la molécula de ácido nucleico aislada de la invención cuando sea necesario bajo
35 condiciones que permiten la expresión eventual de dicha molécula de ácido nucleico aislada, y regenerar una planta transgénica a partir de la célula, en donde la planta exhibe preferiblemente inflorescencia alterada.

También se proporcionan una oligosecuencia de nucleótidos aislada establecida en la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31, un FMT recombinante aislado codificado por una molécula de ácido nucleico de la invención, una molécula de ácido nucleico de FMT recombinante aislado de la invención que
40 comprende una fusión de dos o más secuencias de nucleótidos heterólogas, un organismo procariontico o eucariótico que lleva una secuencia genética que codifica una molécula FMT de la invención extracromosómicamente en forma de plásmido y uso de una molécula de ácido nucleico de la invención en la fabricación de una planta genéticamente modificada en donde la planta genéticamente modificada exhibe flores alteradas o inflorescencia.

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes Ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Material de planta

Las variedades de Petunia utilizadas se presentan en la Tabla 3.

TABLA 3

Genotipos de variedades Petunia hybrida		
Variedad de planta	Propiedades	Fuente/Referencia
V23	An1, An2, An3, An4, An6, An8, An9, An10, ph1, Hf1, Hf2, ht1, Rt, po, Bl, Fl	Wallroth et al. (Mol. Gen. Genet. 202: 6-15, 1986) Doodeman et al. (Theor. Appl. Genet. 67: 357-366, 1984)
R51	An1, An2, An3, an4, An6, An8, An9, An10, An11, Ph1, hf1, hf2, Ht1, rt, Po, bl, fl	Wallroth et al. (1986), supra Doodeman et al. (1984), supra
VR	Híbrido F1 V23 x R51	
Br140	An1, An2, an4, an6/An6*, Ph1, Ph2, Ph5, Hf1, Ht1, Rt, po, Mt1, mf1, mf2, Gf, fl	INRA
Br140w	An1, An2, an4, an6*, Ph1, Ph2, Ph5, Hf1, Ht1, Rt, po, Mt1, mf1, mf2, Gf, fl	Plantas de florescencia blanca de un Br140 propio
Br140p	An1, An2, an4, an6/An6*, Ph1, Ph2, Ph5, Hf1, Ht1, Rt, po, Mt1, mf1, mf2, Gf, fl	Plantas de florescencia púrpura de un Br140 propio
Old Glory Blue (OGB)	Híbrido F ₁ (variedad comercial)	Semilla Ball, USA
V26	An1, An2, An3, an4, An6, An8, An9, An10, An11, Ph1, ph2, Ph5, Hf1, hf2, Ht1, Rt, po, Bl, Gf, Mt1, Mt2, mf1, mg2, Fl	INRA
W162	an1	Vrije Universiteit, Amsterdam

5 INRA = Institut National de la Recherche Agronomique, Cedex, Francia se cultivan plantas petunia OGB en salas especializadas con un longitud de 14 hr en una intensidad de luz de 10,000 lux y una temperatura de 22 a 26° C. Las flores OGB se cosechan en etapas de desarrollo definidas como sigue:

Etapa 1: Brote cerrado, no pigmentado (< 25 mm de longitud).

Etapa 2: Brote cerrado, pigmentado (25-35 mm de longitud).

10 Etapa 3: Brote púrpura oscuro con corola emergente (> 35 mm de longitud).

Etapa 4: Dehiscencia pre-antera de flor abierta púrpura oscura (> 50 mm de longitud).

Etapa 5: Flor completamente abierta con dehiscencia de todas las anteras.

EJEMPLO 2

Métodos Generales

En general, los métodos que siguen son como se describe en Sambrook et al. (1989), supra.

Transformación de E. coli

Las cepas Escherichia coli utilizadas son:-

- 5 DH5a supE44, Δ(lacZYA -ArgF)U169, (ø80lacZΔM15), hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), recA1, endA1 gyrA96, thi-1, relA1, deoR. (Hanahan, J. Mol. Biol. 166: 557, 1983 and. Bethesda Res. Lab. Focus. 8(2): 9, 1986).

XL1-Azul supE44, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1,

lac⁻, [F'proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(tet^R)] (Bullock et al., Biotechniques 5: 376, 1987).

PLK-F' recA, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), mcrA⁻, mcrB⁻, lac⁻, supE44, galK2, galT22,

- 10 metB1, [F' proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(tet^R)] (Stratagene).

El M15E. coli se derivada de E. coli K12 y tiene el fenotipo Nal^s, Str^s, Rif⁻, Thi⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺

Los vectores de clonación pBluescript, pBluescribe y PCRscript se obtienen de Stratagene. Se obtiene pCR 2.1 de Invitrogen.

Los vectores de expresión bacterianos pre-30 y pREP4 se obtienen de QIAGEN.

- 15 Se realiza la transformación de las cepas E. coli de acuerdo con el método de Inoue et al., (Gene 96: 23-28, 1990).

Ligación de ADN

Se llevan a cabo ligaciones de ADN utilizando el Equipo de Ligación Amersham de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante.

Aislamiento y purificación de fragmentos

- 20 Los fragmentos de manera general se aíslan en 1 % de p/vde gel de agarosa y se purifican utilizando el equipo de Extracción de Gel QIAEX II (QIAGEN).

Reparación de extremos salientes después de digestión de restricción

- 25 Se reparan los extremos salientes 5' utilizando polimerasa de ADN (fragmento Klenow) de acuerdo con los protocolos estándar (Sambrook et al., 1989, supra). Se reparan los extremos salientes 3' utilizando polimerasa de ADN T4 de acuerdo con los protocolos estándar (Sambrook et al., 1989, supra).

Remoción de grupos fosforilo de ácidos nucleicos

Se utiliza normalmente fosfatasa alcalina de camarón (SAP) (USB) para retirar los grupos fosforilo de los vectores de clonación para evitar la re-circularización de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Marca ³²P de Sondas de ADN

- 30 Los fragmentos de ADN (50 a 100 ng) se marcan radioactivamente con 50 μCi de [α-³²P]-dCTP utilizando un equipo Gigaprime (Geneworks). Se retira el [α-³²P]-dCTP no incorporado mediante cromatografía en una columna Sephadex G-50 (Fina).

Aislamiento de plásmido

- 35 Se utiliza el fago auxiliar R408 (Stratagene) para cortar fagémidos pBluescript que contienen insertos de cADN de petunia de las colecciones amplificadas de cADN λZAP utilizando los métodos descritos por el fabricante. Se transfectan XL1-Blue E. coli con la mezcla de fagémido y las colonias se ponen en placas sobre placas LB

(Sambrook et al., 1989, supra) que contiene 100 mg/mL de ampicilina. Se analizan colonias únicas para insertos de cADN al cultivar en caldo de cultivo LB (Sambrook et al., 1989, supra) con ampicilina (100 mg/mL) (u otro antibiótico apropiado) y aislar el plásmido utilizando el procedimiento de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989, supra) o utilizando el sistema de purificación de ADN WizardPlus SV minipreps (PROMEGA). Una vez se ha determinado la presencia de un inserto de cADN, las cantidades más grandes de ADN de plásmido se preparan de 50 mL de cultivos durante la noche utilizando un equipo midi QIAfilter Plasmid (QIAGEN).

Análisis de Secuencia de ADN

Se realiza secuenciamiento de ADN utilizando los Equipos de Secuenciamiento de Ciclo de Cebador ABI PRISM (marca comercial registrada) BigDye (marca comercial) de Applied Biosystems. Se siguen los protocolos suministrados por el fabricante. Se realizan reacciones de secuenciamiento de ciclo utilizando una máquina de PCR Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 9600). Se realizan series de secuenciamiento mediante AGRF (Australian Genome Research Facility) en WEHI (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research) en Melbourne, Australia.

Las búsquedas de homología contra las bases de datos Genbank, SWISS-PROT y EMBL se realizan utilizando los programas FASTA y TFASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448, 1988) o los programas BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). Se obtienen los porcentajes de la similitud de secuencia utilizando el programa LFASTA (Pearson and Lipman, 1988, supra). En todos los casos, se utilizan los valores ktup de 6 para las comparaciones de secuencia de nucleótidos y dos para las comparaciones de secuencia de aminoácidos, a menos que se especifique de otra forma.

Se producen múltiples alineaciones de secuencia y gráficas de dendograma utilizando ClustalW (Thompson et al., Nucl. Acids Res. 2: 4673-4680, 1994).

EJEMPLO 3

Transformaciones de Planta

Transformaciones de agrobacterium tumefaciens

La cepa *Agrobacterium tumefaciens* desarmada utilizada es AGL0 (Lazo et al., Bio/technology 9: 963-967, 1991).

Se introduce ADN de plásmido en la cepa *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 al agregar 5 µg de ADN de plásmido a 100 µL de células competentes AGL0 preparadas al inocular 50 mL de cultivo LB (Sambrook et al., 1989, supra) e incubación durante 16 horas con agitación a 28° C. Las células luego se peletizan y se resuspenden en 0.5 mL de 85 % v/v de 100 mM CaCl₂/15 % v/v de glicerol. La mezcla de *Agrobacterium* de ADN se congela mediante incubación en N₂ líquido durante 2 minutos y luego se deja descongelar mediante incubación a 37° C durante 5 minutos. La mezcla de ADN/bacteria luego se pone sobre hielo durante 10 minutos adicionales. Las células luego se mezclan con 1 mL de medio LB (Sambrook et al., 1989 supra) y se incuban con agitación durante 16 horas a 28° C. Las células de *A. tumefaciens* que llevan el plásmido se seleccionan en placas agar LB que contienen los antibióticos apropiados tal como 50 µg/µL de tetraciclina o 100 µg/µL de gentamicina o 30 µg/µL de canamicina. La conformación del plásmido en *A. tumefaciens* se hace mediante mapeo de endonucleasa de restricción del ADN aislado de los transformantes resistentes al antibiótico.

Transformaciones híbridas de Petunia

Como se describe en Holton et al. (Nature, 366: 276-279, 1993) o Brugliera et al., (Plant J. 5, 81-92, 1994) mediante cualquier otro método conocido en la técnica.

(a) Material de Planta

Se trata el tejido de hoja de plantas maduras de *P. hybrida* cv VR con 1.25 % p/v de hipoclorito de sodio durante 2 minutos y luego se enjuaga tres veces en agua estéril. El tejido de hoja luego se corta en cuadrados de 25 mm² y se precultiva en medio MS (Murashige and Skoog, Physiol. Plant 15: 73-97, 1962) complementado con 0.05 mg/L de quinolina y 1.0 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) durante 24 horas.

(b) Co-cultivo del Tejido de *Agrobacterium* y *Petunia*

Se mantiene la cepa *A. tumefaciens* AGL0 (Lazo et al., 1991, supra) que contiene el vector binario a 4° C en placas MG/L (Garfinkel and Nester, J. Bacteriol. 144:732-743, 1980) o agar LB (Sambrook et al., 1989, supra) que contienen el antibiótico apropiado. Una colonia única utilizada para inocular un cultivo líquido durante la noche

5 contiene 1 % p/v de Bacto-peptona, 0.5 % p/v de extracto de levadura Bacto y 1 % p/v de NaCl. Se prepara una concentración final de 5×10^8 células/mL al siguiente día mediante dilución en medio líquido MS que contiene vitaminas B5 (Gamborg et al., Exp. Cell Res. 50: 151-158, 1968) y 3 % p/v de sacarosa (BPM). Los discos de hoja se sumergieron durante 2 minutos en BPM que contiene el AGL0 transformado como se describió anteriormente. Los discos de hoja luego se transfieren secos y se ponen en medio de cocultivo durante 4 días. El medio de co-cultivo consiste de medio SH (Schenk and Hildebrandt, Can. J Bot. 50: 199-204, 1972) complementado con 0.05 mg/L de quinetina y 1.0 mg/L de 2,4-D y se incluye una capa de alimentación de suspensión de células de tabaco rociada sobre el medio de co-cultivo con un papel de filtro puesto sobre la parte superior de la suspensión de células de tabaco.

10 (c) Recuperación de plantas transgénicas de petunia

15 Después de co-cultivo, se transfieren los discos de hoja al medio MS complementado con 3 % p/v de sacarosa, 1 mg/L de α -bencilaminopurina (BAP), 0.1 mg/L de ácido α -naftaleno acético (NAA), 2 mg/L de Clorsulfurón (Chem Service), 350 mg/L de cefotaxima y 0.3 % p/v de Goma Gelano Gelrite (Schweizerhall) (medio de selección). Se transfieren explantes de regeneración al medio de selección fresco después de 4 semanas. Los brotes espontáneos que sobreviven a la selección de clorsulfurón se aíslan y se transfieren a BPM que contiene 2 mg/L de Clorsulfurón (Chem Service) y 200 mg/L de cefotaxima para inducción de raíz. Todos los cultivos se mantienen bajo un fotoperiodo de 16 hr ($60 \text{ mmol. m}^{-2}, \text{ s}^{-1}$ de luz fluorescente blanca fría) a $23 \pm 2^\circ \text{ C}$. Cuando las raíces alcanzan 2-3 cm de longitud las plántulas transgénicas de petunia se transfieren en autoclave a una mezcla de maceta Debco 51410/2 en tubos de 8 cm. Después de 4 semanas las plantas se transfieren en macetas de 15 cm utilizando la misma mezcla de maceta y se mantiene a 23° C bajo un fotoperiodo de 14 horas ($300 \text{ mmol m}^{-2}, \text{ s}^{-1}$ de luz de haluro de mercurio).

Transformaciones de Rosa híbrida

25 Como se describe en la Patente Estadounidense No. 542,841 (PCT/US91/04412) o Robinson y Firoozabady (Scientia Horticulturae, 55: 83-99, 1993), Rout et al. (Scientia Horticulturae, 81: 201-238, 1999) o Marchant et al. (Molecular Breeding 4: 187-194, 1998) o mediante cualquier otro método bien conocido en la técnica.

Los cortes de Rosa hybrida se obtienen de manera general de Van Wyk and Son Flor Supply, Victoria, Australia o Keisei Rosas, Japón

Codificación de color

30 Se utiliza la Carta de Colores de La Sociedad Hortícola Real (Kew, UK) para proporcionar una descripción del color observado. Esto proporciona un medio alternativo por el cual se describen los fenotipos de color observados. Los números designados, sin embargo, solo deben tomar como una guía a los colores percibidos y no se debe considerar que limitan los posibles colores, que se pueden obtener.

Preparaciones de la Construcción

TABLA 4

Abreviaturas utilizadas en las preparaciones de construcción	
ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
35S5'	~0.2 kb incorpora el fragmento BgIII que contiene la región promotora del gen del virus mosaico del coliflor 35S) (CaMV 35S) (Franck et al., Cell 21: 285-294, 1980, Guilley et al., Cell, 30: 763-773. 1982)
e35S5'	~0.7 kb fragmento que incorpora un promotor mejorado CaMV 35S (Mitsubishi et al. Plant Cell Physiol. 37: 49-59, 1996)
GUS	Secuencia codificante de β -glucuronidasa (Jefferson, et al., EMBO J. 6: 3901-3907, 1987)
Mac	Promotor híbrido que consiste del promotor del gen mas y una región mejoradora CaMV 35S (Comai et al., Plant Mol. Biol. 15: 373-381, 1990)
nos 5'	Región promotora del gen de sintasa nopalina de A. tumefaciens (Depicker, A. et al., J Mol. y Appl. Genetics, 1: 561-573, 1982)
nos 3'	Región terminadora del gen de sintasa nopalina de A. tumefaciens (Depicker, A. et al., 1982, supra)

(continuación)

Abreviaturas utilizadas en las preparaciones de construcción	
ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
nptII	Gen de resistencia a canamicina (codifica la fosfotransferasa de neomicina que desactiva los antibióticos aminoglicosida tales como canamicina, neomicina y G418)
ocs 3'	Región terminadora del gen de sintasa octopina de <i>A. tumefaciens</i> (descrito en Klee et al., Bio/Technology 3: 637-642, 1985)
petD8 3'	~0.8 kb fragmento que incorpora la región terminadora del gen de proteínas de transferencia de fosfolípido (D8) de <i>Petunia hybrida</i> cv. OGB (Holton, 1992, supra)
SuRB	Gen de resistencia a clorsulfurón (codifica la Sintasa Acetolactato) con su propio terminador de <i>Nicotiana tabacum</i> (Lee et al., EMBO J. 7: 1241-1248, 1988)
BP#40 o Viola F3'5'H	~1.7kb fragmento que contiene el clon de cADN F3'5'H del pensamiento negro variedad <i>Viola</i> sp. (Solicitudes de Patente Provisionales Australianas No. 2002951088 y 2002952835 tituladas "Secuencias genéticas y usos de las mismas", 2002)
PFMT	~1.0 kb fragmento que incorpora la metiltransferasa flavonoide de <i>Petunia</i> del clon de cADN E20 (inter alia)
TFMT	~ 1.0 kb fragmento que incorpora el clon de cADN de metiltransferasa flavonoide <i>Torenia</i> (inter alia)
FFMT	~ 1.0 kb fragmento que incorpora el clon de cADN de metiltransferasa flavonoide <i>Fuchsia</i> (inter alia)

EJEMPLO 4

Incubación de pétalos cortados con precursores o los productos finales

- 5 Los reportes en la literatura sugieren que de las seis antocianidinas que ocurren principalmente se encuentran en la naturaleza (Tabla 5), el grado de "azulamiento" de una antocianidina individual está influenciado por el patrón de hidroxilación y/o metilación en el anillo antocianina "B". Sin embargo, 0.01 % de soluciones HCl/MeOH (v/v) de delphinidina tienen un mayor valor λ_{\max} que la peonidina o malvidina y de esta manera aparece el color más azul de las seis antocianidinas.

10 TABLA 5

Valores λ_{\max} (en nm) de antocianidinas principales	
ANTOCIANIDINA	λ_{\max} nm*
Pelargonidina	520
Cianidina	535
Peonidina	532
Delphinidina	546

(continuación)

Valores λ_{\max} (en nm) de antocianidinas principales	
ANTOCIANIDINA	λ_{\max} nm*
Petunidina	543
Malvidina	542

La longitud de onda λ_{\max} nm* de la absorción máxima en 0.01 % de HCl/MeOH (v/v)

Datos revisados por Haslam (Practical Phenolics. From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, UK, 1998).

- 5 Se establecen experimentos para determinar si la producción de delfinidina o su derivado metilado, malvidina conduciría a colores novedosos en pétalos de rosa. Para determinar si los pétalos de rosa contienen las enzimas necesarias se inicia la conversión de dihidromiricetina a delfinidina, experimentos de carga de precursor con dihidromiricetina.

- 10 Los segmentos de pétalo de una selección de variedades comerciales de rosas (Toplesse, Lambada, Medeo, Pamela, Sonia, Oceana, Mystique) se ponen en soluciones de 1-2 mg/mL de dihidromiricetina o agua solo y se incuban durante alrededor de 16 horas en una habitación de cultivo en una temperatura de alrededor de 23° C. Se observan colores rosado/púrpura cerca a los bordes cortados de los pétalos (Tabla 6). El análisis TLC de las antocianidinas en los segmentos rosado/púrpura revela la producción de delfinidina. Estos resultados confirman que las enzimas de la ruta antocianina de rosas son capaces de convertir la dihidromiricetina a delfinidina.

- 15 TABLA 6

Colores producidos en pétalos de rosa después de incubación de dihidromiricetina (el precursor de los pigmentos basados en delfinidina)		
Variedad de rosa	Color de pétalo de rosa	Color en borde de corte después de incubación en DHM
Toplesse	Rosado	rosado/púrpura
Lambada	Naranja	rosado/púrpura
Medeo	albaricoque pálido	rosado/púrpura
Pamela	blanco/rosado pálido	rosado/púrpura
Sonia	albaricoque/rosado	rosado/púrpura
Oceana	Crema	rosado/púrpura
Mystique	albaricoque	rosado/púrpura
DHM = dihidromiricetina		

- 20 Los pétalos de rosa de Toplesse y Lambada se incuban posteriormente con 3, 5-diglucósido malvidina para determinar el color que se puede obtener de esta antocianina novedosa se producen en rosa por medio de la introducción de un gen 3' 5' hidroxilasa flavonoide para la producción de pigmentos con base en delfinidina y un gen 3' 5' metiltransferasa flavonoide (o genes 3' metiltransferasa flavonoide y 5' metiltransferasa flavonoide) para la conversión posterior a los pigmentos basados en malvidina.

5 Los segmentos pétalo de las rosas se ponen en soluciones de 1-2 mg/mL de malvidina 3, 5-diglucósido, 1-2 mg/mL de dihidromirectina o agua solo y se incuba durante alrededor 16 horas en una habitación de cultivo a una temperatura de alrededor de 23° C. La producción de colores en gama púrpura se observan cerca los bordes de corte de los pétalos luego de incubación con dihidromirectina o 3, 5-diglucósido malvidina (Tabla 7). Sin embargo una comparación directa de los colores observados con la producción de delfinidina en los pétalos de rosa para la acumulación de malvidina en el mismo fondo de rosa revela de forma sorprendente que los pigmentos de malvidina resultan en colores más azules.

TABLA 7

Colores observados en pétalos de rosa después de incubación en dihidromiricetina (el precursor de pigmentos con base en delfinidina) o en 3, 5-diglucósido malvidina			
Variedad de rosas	Color de pétalo	Color en el borde luego de la producción de delfinidina	Color en el borde luego de la producción de malvidina
Toplesse	rosado	rosado/púrpura	violeta/púrpura
Lambada	naranja	rosado/púrpura	violeta/púrpura

10 Experimentos de Reconstrucción

Se realizan experimentos de reconstrucción con extractos de pétalo de rosa y diversas antocianinas para predecir el color que se produciría en las rosas luego de la producción de pigmentos con base en delfinidina o malvidina.

15 El Medeo de variedad de rosa de manera general produce flores color crema a albaricoque pálido (RHSCC 158C a 159A). El análisis HPLC de las antocianinas y flavonoles que se acumula en pétalos de rosa Medeo revela que los pétalos acumulan altos niveles de flavonoles (2.32 mg/g de camferol, 0.03 mg/g de quercetina) y muy bajos niveles de antocianinas (0.004 mg/g de cianidina, 0.004 mg/g de pelargonidina). El pH vacuolar estimado de pétalos Medeo es alrededor de 4.6. El jugo del pétalo de rosas Medeo se extrae al moler un pétalo con 50 µL de agua utilizando mortero y pestillo. Se recolecta el jugo del pétalo y se mezcla con 10-20 µL de 1-2 mg/g de 3-glucósido delfinidina, 3,5-glucósido de delfinidina y 3, 5- diglucósido malvidina. Los colores observados se describen de acuerdo con las
20 Cartas de Color de La Sociedad Hortícola Real (RHSCC) (La Sociedad Hortícola Real, London) (Tabla 8).

TABLA 8

Colores observados luego de la adición de 3-glucósido delfinidina, 3, 5-diglucósido delfinidina o 3, 5-diglucósido malvidina al jugo de pétalo extraído de pétalos de rosa Medeo			
ANTOCIANINA	pH	RHSCC#	COLOR
D3G	4.9	74A	red-púrpura
D35G	4.9	88A	Violeta
D35G	4.6	88A	Violeta
M35G	4.9	90A	violeta-azul
M35G	4.6	88A/90A	violeta-azul
D3G = 3-glucósido delfinidina, D35G = 3, 5-diglucósido delfinidina M35G = 3, 5-diglucósido malvidina			

Con base en el valor λ_{\max} (Tabla 5), se asume que la producción de pigmentos en pétalos de rosa resultaría en un color más azul que la producción de pigmentos malvidina. Sin embargo, a partir de los experimentos de carga y reconstrucción detallados anteriormente es claro que la producción de pigmentos basados en malvidina en pétalos de rosa conduciría a colores más azules que aquellos de los pigmentos con base en delphinidina.

5 EJEMPLO 5

Aislamiento de un clon de cADN de S-adenosil-L-metionina: metiltransferasa flavonoide parcial (FMT)

Construcción de *Petunia hybrida* y detección de una colección de cADN de pétalo de *P. hybrida* cv. V26

Se construye una colección de cADN con base en mRNA del tejido de extremidad de la corola en la estirpe V26 (An1⁺) (Kroon et al., Plant J 5: 69-80, 1994). Se colocan en placas alrededor de 30,000 pfu de la colección de cADN floral V26 en una densidad de 800 pfu por 90 mm de placa. Los duplicados de estos se colocan sobre membranas Hybond-N (Amersham) y se tratan como se recomienda por el fabricante. Los filtros se hibridan con la primera hebra de cADN de una estirpe An1+ (V26) y an1- (W162). Las condiciones de hibridación incluyen una etapa de prehibridación en 50 % v/v de formamida, 5 x SSPE, 5 x de Denhardt, 0.1 % p/v de SDS, 100 µg/µL de ADN de esperma de arenque a 42° C durante 3 horas. Para hibridación se agregan cADN de primera hebra marcado ³²P de 1.0 x 10⁸ cpm y 100 mg de poli (A) y se continua la incubación durante 16-48 horas a 42° C. Los filtros se lavan en 1 x SSC/0.1 % p/v de SDS a 60° C durante 30 minutos y luego se expone a la película Kodak XAR durante 3 a 4 días. Doscintas setenta unidades formadoras de placa (pfu) de 30,000 muestran hibridación sustancialmente más fuerte para la sonda de cADN An1+ que para la sonda de cADN an1-. De estos, se purifican 35 que no se hibridan en genes de pigmentación previamente clonados (chs, chi y dfr) para homogeneidad. Las hibridaciones cruzadas de par base demuestran que estos 35 clones representan 7 clases distintas de genes difA, difC, difE, difF, difG, difH y difI. Se ha mostrado posteriormente que el gen difG representa el gen Rt de *Petunia hybrida* (Kroon et al., 1994, supra). Los perfiles de expresión de las 6 clases restantes se muestran por exhibir un control genético, temporal y espacial similar a aquel de difG (Kroon et al., 1994, supra).

El clon difC se muestra posteriormente para representar el gen antocianidina 3-rutinosida aciltransferasa (AR-AT) de *Petunia hybrida* (Solicitud Internacional No. PCT/AU01/00358; Publicación Internacional No. WO 01/72984).

Se muestra que el clon difE tiene alrededor de 1kb y el plásmido se asigna a la desingación pCGP1903 (Figura 2). La secuencia completa del clon de cADN difE (SEQ ID NO: 1) (contenido en pCGP1903) se determina mediante la compilación de la secuencia de 18 diferentes subclones pUC obtenidos utilizando los procedimientos estándar para la generación de clones traslapantes aleatoriamente (Sambrook et al., 1989, supra). Las búsquedas Blast contra las secuencias en la base de datos GenBank revelan similitudes en mRNA de cafeoil-CoA O-metiltransferasa. (Por ejemplo 84 % de identidad sobre una extensión de 92 bp de cafeoil-CoA O-metiltransferasa *Mesembryanthemum crystallinum* (AF053553)).

El análisis RFLP indica que el clon difE se liga a los locus Hf2 y Po (5 cruces de 33 plantas con el locus Po y 8 cruces con Hf2 de 34 plantas) en el cromosoma V y así es un candidato para el gen Mt2 o Mf2. Las transferencias de gel de ARN se realizan posteriormente en diversos mutantes Mf y Mt y se muestra que cuatro mutantes dobles (mf1-, mf2-, mt1-, mt2-) carecen de transcriptos que hibridan a difE, mientras que las estirpes dominantes para uno o más de estos locus contienen los transcriptos difE. Esto sugiere que el clon difE codifica una metiltransferasa flavonoide y que los diferentes transcriptos FMT hibridan en forma cruzada. El clon difE se selecciona para análisis adicional.

40 EJEMPLO 6

Aislamiento de un clon de cADN FMT de longitud completa de *Petunia hybrida* cv Old Glory Blue (OGB)

Construcción de la colección de cADN de pétalo OGB

Se aísla ARN total del tejido de pétalo de *P. hybrida* cv Old Glory Blue (OGB) etapa 3 para 4 flores utilizando el método de Turpen y Griffith (BioTechniques 4: 11-15, 1986). Se selecciona el ARN poli(A)+ del ARN total mediante tres ciclos de cromatografía de celulosa oligo-dT (Aviv and Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408, 1972).

Se transcriben en forma inversa dos microgramos de ARN poli(A)+ en un volumen de reacción de 20 µL que contiene el regulador de reacción 1 x Superscript (marca comercial), 10 mM ditiotretitol, 500 µM dATP, 500 µM dGTP, 500 µM dTTP, 500 µM 5-metil-dCTP, 0.75 µg de oligonucleótido (5' GAGAGAGAGAGAGAGAGATCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT) [SEQ ID NO: 3] y 2 µL de transcriptasa inversa Superscript (marca comercial) (BRL). La mezcla de reacción se incubaba a 37° C durante 50 minutos, 44° C durante 10 minutos y luego se pone en hielo.

Se agrega una segunda mezcla de reacción de hebra (140 μ L) a la primera mezcla de reacción de hebra. La segunda mezcla de reacción de hebra consiste de 21 mM Tris-HCl, 104 mM KCl, 5.3 mM MgCl₂, 171 μ M β -NAD, 11.4 mM (NH₄)₂SO₄, 214 μ M dATP, 642 μ M dCTP, 214 μ M dGTP, 214 μ M dTTP, 4 mM DTT, 10 μ Ci ³²P-dCTP (3000 Ci/mMol), 15 unidades de ligasa de ADN E. coli, 40 unidades de polimerasa I de ADN E. coli (Boehringer) y 0.8 unidades de ARNsa H. La mezcla final se incuba durante 150 minutos a 16° C. Para hacer el cADN de extremo romo de doble hebra, se agrega 10 unidades de polimerasa de ADN T4, y la reacción continua durante 15 minutos adicionales a 16° C. La reacción se detiene y el cADN purificado mediante extracción de fenol/cloroformo, seguido por extracción de cloroformo y precipitación de etanol.

Se ligan los adaptadores EcoRI (Promega) con el cADN y luego se quinasaron utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. Las enzimas se desnaturalizan con calor (70° C, 20 minutos) y el ADN se purifica mediante la extracción de fenol/ cloroformo y precipitación de etanol. El cADN se digiere con 50 unidades de la endonucleasa de restricción XhoI (Boehringer Mannheim) en un volumen de reacción de 100 μ L, utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. La enzima se mata con calor (70° C, 20 minutos) y la mezcla se pasa a través de una columna de giro S400 (Farmacia) que se ha equilibrado en regulador STE (Sambrook et al., 1989, supra). El eluado se extrae con fenol/cloroformo y se precipita con etanol. Después de microcentrifugación a 4° C durante 30 minutos el gránulo de cADN resultante se enjuaga con 70 % v/v de etanol, se seca al aire y se resuspende en 10 μ L de regulador TE (1 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA).

Se liga una alícuota de 2.5 μ L de la mezcla de cADN resuspendida con 1 mg de λ ZAPII EcoRI/XhoI/CIAP (fosfatasa alcalina intestinal de becerro) tratado con vector (Stratagene) en 5 μ L del regulador de reacción que consiste de 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotreitol, 1 mM ATP y 2 unidades de ligasa de ADN T4. La reacción se lleva a cabo a 4° C durante 4 días.

Después de una incubación posterior a temperatura ambiente durante dos horas, la mezcla de reacción de ligación se empaca utilizando el sistema Packagene (Promega). El número total de recombinantes es 1×10^6 pfu.

Después de transfectar las células PLK-F's, se coloca en placas el λ ZAPII/cADN empacado a 50,000 pfu por plato petri de 15 cm de diámetro. Las placas se incuban a 37° C durante ocho horas, y los fagos se eluyen en 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.01 % de gelatina (Regulador de Almacenamiento de Fago (PSB)). Se agrega cloroformo y el fago se almacena a 4° C como una colección amplificada.

Se ponen en placas 40,000 pfu de la colección amplificada en placas NZY (Sambrook et al., 1989, supra) en una densidad de 20,000 pfu por placa de 15 cm después de transfectar las células XL1-Blue MRF', y se incuban a 37° C durante 8 horas. Después de una incubación posterior a 4° C durante la noche, los duplicados se toman en filtros de Colonia/Detección de Placa (marca comercial) (DuPont) que luego se tratan según se recomienda por el fabricante.

Detección de la colección OGB

Antes de la hibridación, la placa de duplicado se lava en solución de pre-lavado (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % p/v de sarcosina) a 65° C durante 30 minutos; se depura en 0.4 M hidróxido de sodio a 65° C durante 30 minutos; luego se lava en una solución de 0.2 M Tris-HCl pH 8.0, 0.1 x SSC, 0.1 % p/v de SDS a 65° C durante 30 minutos y finalmente se enjuaga en 2 x SSC, 1.0 % p/v de SDS.

Los duplicados de la colección de cADN de pétalo OGB se detectan con los fragmentos marcados ³²P de un fragmento EcoRI/ XhoI difE de pCGP1903 (Figura 2).

Las condiciones de hibridación incluyen una etapa de prehibridación en 50 % v/v de formamida, 1 M NaCl, 10 % p/v de sulfato de dextrano, 1 % p/v de SDS a 42° C durante por lo menos 1 hora. Los fragmentos marcados ³²P (a 1×10^6 cpm/mL) luego se agregan a la solución de hibridación y la hibridación se continua a 42° C durante 16 horas adicionales. Los filtros luego se lavan en 2 x SSC, 1 % p/v de SDS a 42° C durante 2 x 30 minutos seguido por un lavado en 0.2 x SSC, 1 % p/v de SDS a 65° C durante 30 minutos y se expone a la película Kodak XAR con una detección intensificante a -70° C durante 4 horas.

Se añaden cuarenta y cinco placas hibridantes (designadas como E1 a E45) al PSB. Estas se vuelven a detectar para aislar clones puros, utilizando las condiciones de hibridación como se describe para la detección inicial de la colección de cADN. Los plásmidos contenidos en el vector de bacteriófago λ ZAP se rescataron y se generaron datos de secuencia de los extremos 3' y 5' de los insertos de cADN. De estos E20 y E33 representan los clones de cADN más largos (~1.0kb y 0.9kb, respectivamente) y los plásmidos se designan pCGP1907 y pCGP1908 (Figuras 3 y 4, respectivamente).

La secuencia de nucleótidos completa de los clones de cADN E20 y E33 (SEQ ID NOs: 4 y 6) (contenidas en pCGP1907 y pCGP1908, respectivamente) se determina mediante la compilación de la secuencia generada utilizando cebadores M13 y M13 -21 inversos disponibles comercialmente con un cebador 1903F específico de

5 Petunia MT (5' CTT GCT TTG CCA GAA GAT GG 3') [SEQ ID NO: 8]. El clon de cADN E20 tiene 888 bp de longitud y contiene un marco de lectura abierto putativo de 789 bases que codifican un polipéptido putativo de 263 aminoácidos (SEQ ID NO: 5). La secuencia E20 es idéntica a la secuencia difE sobre 822 bp con el clon de cADN E20 que tiene una secuencia no traducida 5' extra 27bp y una reducción de 96 bp de la secuencia no traducida 3' cuando se compara con la secuencia difE.

10 La secuencia E33 tiene 1076 bp de longitud y contiene un codón de parada en marco en la posición 469 (SEQ ID NO: 6). La secuencia E20 comparte 82 % de identidad sobre 797 bp con la secuencia E33 en el nivel de nucleótido. Una alineación de la secuencia de nucleótidos E33 con aquella de la secuencia E20 revela una eliminación evidente de 2 nucleótidos ("CT") en la secuencia E33 que resulta en un codón de parada en marco. Puede ser que el clon E33 en la variedad OGB se derive de un gen mutado. Con el fin de examinar la secuencia de aminoácidos deducida presumida del gen no mutado representado por el clon E33, 2 nucleótidos ("CT") se agregan a la secuencia E33 para producir la secuencia de nucleótidos E33 corregida (SEQ ID NO: 26). La secuencia de aminoácidos deducida se representa por la SEQ ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos E33 corregida comparte 82 % de identidad con la secuencia E20 sobre la sobreposición de 243 aminoácidos.

15 Una comparación de la secuencia de nucleótidos traducida de E20 con las secuencias en la base de datos GenBank revela similitud en diversas cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasas. Por ejemplo, 60 % de identidad sobre 227 aminoácidos con Caffeoul- CoA 3-O-metiltransferasa d *Populus kitakamiensis* (número de acceso Genbank AB000408) y 53 % de identidad sobre 238 aminoácidos de una trans-cafeoul-CoA 3-O-metiltransferasa (CCOFMT) (CCOAMT) de *Petroselinum crispum* (número de acceso Genbank A40975).

20 **EJEMPLO 7**

Actividad de metiltransferasa del clon de cADN de Petunia FMT (E20) expresado en *E. coli*

Para confirmar si el clon de cADN de Petunia E20 codifica un FMT funcional se expresa en un sistema de expresión *E. coli* y se evalúa para actividad FMT.

Clonación de E20 en el vector de expresión *E. coli* pQE30 (Construcción de pCGP3086)

25 Con el fin de clonar el clon de Petunia E20 (PFMT) en un vector de expresión *E. coli*, pQE30 (QIAGEN), se requiere una endonucleasa de restricción BamHI en la iniciación de traducción ATG y un sitio de restricción de endonucleasa PstI se requiere inmediatamente 3' para el codón de parada putativo.

30 Los oligonucleótidos 1907BamHI F [SEQ ID NO: 9] y 1907PstI R (SEQ ID NO: 10) (Tabla 9) se utilizan como cebadores con pCGP 1907 como plantilla para amplificar el clon Petunia FMT (E20) con un sitio de reconocimiento de restricción endonucleasa BamHI en lugar de iniciar AUG y un sitio de reconocimiento de restricción de endonucleasa PstI justo después del codón de parada putativo. Las condiciones PCR incluyen 5 µL de regulador de polimerasa de ADN 10 x PfuTurbo (Stratagene), 2 mL de 10 mM dNTP, 2 µL de 20 µg/µL 1907BamHI F [SEQ ID NO: 9], 2 µL de 20 µg/µL 1907PstI R [SEQ ID NO: 10], 1 µL de 1 µg/µL de plantilla pCGP1907, 37 µL de agua pura y 1 µL de polimerasa de ADN PfuTurbo (Stratagene). El PCR se incubaba a 95° C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos y 72° C durante 1 minuto y luego una incubación final a 72° C durante 10 minutos con almacenamiento posterior a 4° C.

TABLA 9

Oligonucleótidos utilizados en la clonación del clon de cADN E20 en el vector de expresión bacteriano pQE30		
SEQ ID NO:	NOMBRE	SECUENCIA
9	1907BamHI F	GCAT GGA TCC ACA GGC AAA ACC GCC CAC CCT G
10	907PstI R	GCAT CTG CAG CTA GGA GAG ACG CCT GCA AAG

40 Los productos PCR resultantes se someten a electroforesis a través de 1% p/v de gel de agarosa y se aísla una banda de 0.72 kb y se purifica utilizando un equipo de Extracción de Gel QIAEX II (QIAGEN) de acuerdo con la recomendación del fabricante. Los productos aislados luego digieren la endonucleasa de restricción PstI. El producto de digestión se purifica utilizando un equipo de purificación PCR QIAquick (QIAGEN) y luego se digiere con la endonucleasa de restricción BamHI. Los productos digeridos BamHI/PstI se purifican finalmente utilizando un equipo de purificación PCR QIAquick (QIAGEN) y posteriormente se ligan con los extremos BamHI/PstI del vector pQE30

(QIAGEN) utilizando un Equipo de Ligación de ADN (Amersham) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los transformantes se analizan para la presencia del inserto específico de 0.72 kb utilizando las digestiones de endonucleasa de restricción BamHI/ PstI. La secuencia del inserto se confirma mediante el análisis de secuencia utilizando un Conjunto de Cebador de Secuenciamiento pQE (QIAGEN). El plásmido resultante se designa pCGP3086 (mut-E20 en pQE30) (Figura 5).

Como una consecuencia de utilizar los oligonucleótidos 1907BamHI F [SEQ ID NO: 9] y el 1907PstR [SEQ ID NO: 10] como cebadores en el PCR y de la clonación posterior del producto en pQE30, la secuencia del clon Petunia E20 se altera alrededor de la metionina de iniciación putativa del polipéptido codificado. Como una consecuencia los aminoácidos esperados alrededor de la metionina de iniciación putativa se cambian de "M T G K T A H P" a "M R G S H H H H H G S T G K T A H P".

De acuerdo con el fabricante, "la etiqueta 6 x His es mucho más pequeña que otras etiquetas de afinidad y no se carga a pH fisiológico. Esto raramente altera o contribuye a la inmunogenicidad de la proteína, raramente interfiere con la estructura o función de la proteína, no interfiere con la secreción, no requiere la remoción mediante la división de proteasa, y es compatible con sistemas de regulador desnaturizante". (QIAGEN website, <http://www.qiagen.com>).

Para el análisis de la actividad metiltransferasa del clon E20, se introduce posteriormente pCGP3086 en células E. coli M15 (pREP4) (QIAGEN) de acuerdo con el método de Inoue et al., 1990, supra 10 mL de LB que contiene ampicilina a 100 µg/mL (LB/Amp100) se inocula con una colonia única de pCGP3086 en células M15/pREP4 y se incuba a 37° C con agitación durante 16 horas. Luego se utiliza un milímetro de este cultivo para inocular 25 µL de LB/Amp100. El cultivo se incuba a 37° C con agitación durante alrededor de 2 horas hasta que la Absorbancia a 600 nm (A600) está entre 0.5 a 0.7. Luego se agrega IPTG (iso-propil-β-D-tiogalactosida) en una concentración final de 1 mM y el cultivo se incuba adicionalmente a 37° C con agitación con 1.5 µL de las alícuotas que se retiran a 0, 1, 2 y 5 horas después de la adición de IPTG.

Las células contenidas en cada alícuota se peletizan posteriormente mediante centrifugación y luego se resuspenden en 50 µL 8 M de regulador desnaturizante de urea (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01M Tris-HCl, pH 8). Los lisados se centrifugan a 14,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para peletizar los residuos celulares. Los extractos de proteína cruda se desnaturizan al hacerlos hervir en 10 % de glicerol, 3 % p/v de dodecil sulfato de sodio (SDS), 3 % de β-mercaptoetanol (BME) y 0.025 % de azul bromofenol y luego se someten a electroforesis a través de geles profundos SDS (12 % de resolución, 4 % de gel de apilamiento) (Ready Gel, BIORAD) en un regulador de corrida hecho de 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glicina, 0.1 % p/v de SDS a 120V durante 80 min. Los estándares incluyen marcadores de Rango bajo preteñidos (BIORAD) que contiene las muestras de proteína estándar de 116 kDa, 80 kDa, 51.8 kDa y 34.7 kDa.

Las proteínas se visualizan mediante tinción con Azul Coomassie Brillante (CBB) (0.25 % p/v de CBB, 45 % v/v de metanol, 10 % v/v de ácido acético). Una banda fuertemente teñida del tamaño esperado para una fusión de His-Tag de la proteína Petunia FMT (E20) se detecta a 27.5 kDa. Las proteínas en un gel duplicado SDS-PAGE gel para aquel descrito anteriormente también se electro-transferen a la membrana PVDF de inmunotransferencia (BIORAD) a 4° C en un regulador de 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 20 % de metanol y 192 mM glicina a 100V durante 60 min. La presencia del His-tag fusionado a la proteína específica codificada por el clon de cADN E20 en pCGP3086 se confirma mediante detección con un conjugado Ni-NTA-AP (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una banda de proteína fuertemente teñida que se estima es 27.5 kDa se detecta confirmando la presencia y la expresión de alto nivel de la proteína recombinante E20. No son visibles bandas en un control pQE30 bajo estas condiciones de detección.

Preparación de extractos de proteína cruda

Se inoculan 10 µL de LB que contiene ampicilina a 100 µg/mL y canamicina a 25 µg/mL (LB/Amp100 + Kan25) con una colonia única de pCGP3086 o pQE30 en células M15 (pREP4). El cultivo se incuba a 30° C con agitación durante 16 horas. Luego se agrega 2.5 mL de este cultivo a 25 mL de LB/Amp100+Kan25 fresco y el cultivo frescamente inoculado se incuba a 30° C con agitación hasta que se alcanza un A₆₀₀ de 0.5 a 0.7. Luego se agrega IPTG en una concentración final de 1mM y el cultivo luego se incuba a 30° C con agitación durante 8 horas. Las células se peletizan mediante centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos a 4° C. El gránulo se resuspende en 1 mL de 0.1 M NaPi, pH 7.5, 4 mM MgCl₂. Luego se agrega lisozima frescamente preparada en una concentración final de 1 mg/mL y la mezcla se incuba en hielo durante 30 minutos. La mezcla luego se somete a sonicación durante dos ráfagas de 10 segundos en salida 2-3 y luego se incuba en hielo durante 30 minutos. Los residuos celulares se peletizan mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4° C. El sobrenadante se pasa a través de una columna NAP-10 (Pharmacia) y 1.5 mL de la muestra se recolecta en 0.1 M NaPi, pH 7.5, 4 mM MgCl₂.

Actividad de metiltransferasa

La actividad de la enzima del clon de Petunia E20 contenido en pCGP3086 se evalúa inicialmente utilizando los sustratos 3-glucósido delfinidina y 3-rutinosida delfinidina bajo condiciones de ensayo como se describe en Jonsson et al. (1983), supra.

5 Los ensayos de metiltransferasa se establecen de acuerdo con la Tabla 10 en un volumen de reacción total de 50 μ L.

TABLA 10: Composición de ensayos de metiltransferasa utilizando homogenatos crudos de cultivos bacterianos que contienen los plásmidos pCGP3086 (E20) o pQE30 (control).

#	Plásmido	Homogenato crudo (μ L)	3 mg/mL de D3R (μ L)	3 mg/mL de D3G (μ L)	14 C-SAM (μ L)	Regulador (μ L)
1	pQE30	20	5	0	5	20
2	pQE30	20	-	5	5	20
3	pQE30	20	5	0	0	25
4	pQE30	20	0	5	0	25
5	pQE30	20	0	0	5	25
6	ninguno	0	5	0	5	40
7	ninguno	0	0	5	5	40
8	pCGP3086	20	5	0	5	20
9	pCGP3086	20	-	5	5	20
10	pCGP3086	20	5	0	0	25
11	pCGP3086	20	0	5	0	25

= número de tubo,
D3G = 3-glucósido delfinidina,
D3R = 3-rutinosida delfinidina,
 14 C-SAM = 0.6 M 14 C-SAM (13 μ Ci/mmol) (Amersham Pharmacia),
Regulador = 0.1 M NaPi, pH 7.5, 4 mM MgCl₂

10 Las reacciones de ensayo se incuban a 30° C durante 30 minutos. Se agrega cincuenta microlitros de una mezcla de cloroformo (CHCl₃: metanol/1 % de HCl, 2:1) y la mezcla luego se centrifuga para detener las reacciones. Las fases se separan mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 5 minutos y 50 μ L de la fase superior se transfiere en un tubo limpio y los contenidos se hidrolizan posteriormente mediante la adición de 12.5 μ L de 10 M HCl. El tubo luego se pone en un baño de agua hervida durante 30 minutos y los contenidos se disecan posteriormente bajo vacío. El residuo se resuspende en 2-3 μ L de metanol/1 % de HCl y se coloca sobre una placa TLC a lo largo de las muestras estándar de petunidina, malvidina y delfinidina. Las antocianidinas se separa en un sistema Forestal (HOAc: agua: HCl; 30: 10: 3) (Markham, Techniques of flavonoid identification., Academic Press, London, 1982) y el TLC se expone a una película autoradiográfica (Kodak) durante 16 horas a -70° C.

15

TABLA 11

Resultados de ensayos de metiltransferasa de extractos de E. coli que contiene el vector de control pCGP3086 o pQE30 utilizando 3-glucósido delfinidina o 3-rutinosida delfinidina como sustrato y ¹⁴ C-SAM como el donante de metilo							
#	Plásmido	Homogenato crudo	D3R	D3G	¹⁴ C-SAM	Petunidina	Malvidina
1	pQE30	+	+	-	+	no	no
2	pQE30	+	-	+	+	no	no
3	pQE30	+	+	-	-	no	no
4	pQE30	+	-	+	-	no	no
5	pQE30	+	-	-	+	no	no
6	Ninguno	-	+	-	+	no	no
7	Ninguno	-	-	+	+	no	no
8	pCGP3086	+	+	-	+	si	si
9	pCGP3086	+	-	+	+	si	si
10	pCGP3086	+	+	-	-	no	no
11	pCGP3086	+	-	+	-	no	no

= número de tubo,
D3G = 3-glucósido delfinidina,
D3R = 3-rutinosida delfinidina,
¹⁴C-SAM = S-adenosil-L-metionina marcado ¹⁴C (Amersham Biosciences),
+ = presente en la mezcla de reacción
- = ausente de la mezcla de reacción
si = detección del producto en TLC,
no = no se observa reacción como se determina por la ausencia de producto.

Se detectan petunidina y malvidina, los derivados metilados de delfinidina, en las reacciones de ensayo utilizando homogenatos crudos de las células pCGP3086 junto con los sustratos D3R o D3G (Tubos 8 y 9, Tabla 11). No existe producción detectable de petunidina y malvidina en las reacciones de ensayo utilizando homogenatos crudos de las células pQE30 (Tubos 1 a 5, Tabla 11) o no tienen homogenatos crudos agregados (Tubos 6 y 7, Tabla 11) o en las reacciones de ensayo sin la adición de ¹⁴C-SAM (Tubos 10 y 11, Tabla 11). Los resultados obtenidos con la expresión del clon de cADN E20 en un sistema de expresión E. coli proporciona evidencia adicional que sugiere que el clon de cADN E20 de Petunia codifica un FMT que es capaz de metilar 3-glucósido delfinidina y 3-rutinosida delfinidina utilizando SAM como un donante de metilo para producir el derivado derivado 3' metilado, petunidina y el derivado 3' 5' metilado, malvidina.

EJEMPLO 8

Expresión anticodificante de FMT en plantas

Los clones de Petunia FMT (E20 y E33) cada uno se clonan en una orientación anticodificante entre un promotor Mac (Comai et al., 1990, supra) y se introducen en la estirpe híbrida de petunia VR de flor púrpura.

Construcción de pCGP40

5 Se construye el plásmido pCGP40 al retirar el gen GUS (Jefferson et al., EMBO J 6(13): 3901-3907, 1987) como un fragmento de endonucleasa de restricción BamHI-SacI de pCGN7334 y lo reemplaza con el fragmento de endonucleasa de restricción BamHI-SacI de pBluescribe M13⁺ que incluye el sitio multi-clonación. El plásmido pCGN7334, obtenido de Calgene Inc. (CA, USA), se construye al insertar el fragmento que contiene la fusión de gen Mac: GUS: mas 3' en el sitio de endonucleasa de restricción XhoI de pCGN7329 (Comai et al., Plant Molecular Biology 15: 373-381, 1990).

Construcción de pCGP1910 y pCGP1911

15 Se construyen los plásmidos pCGP1910 y al clonar los insertos de cADN respectivos de pCGP1907 y pCGP1908 (Figura 3 y 4) en una orientación anticodificante entre el promotor Mac (Comai et al., 1990, supra) de pCGP40. La región codificante GUS en pCGP40 se retira mediante digestión con las endonucleasas de restricción SacI/Asp718. El vector que contiene el promotor Mac y el terminador mas se purifica utilizando el Equipo GeneClean (Bresatec) y se liga con los extremos endonucleasa de restricción SacI/Asp718 de los fragmentos de cADN Petunia E20 y E33 liberados de pCGP1907 y pCGP1908 respectivamente. La inserción correcta de los insertos E20 y E33 en pCGP1910 y pCGP1911 se establece mediante el análisis de endonucleasa de restricción SacI/Asp718 del ADN aislado de los transformantes resistentes a cloramfenicol.

20 Los plásmidos pCGP1918 (Figura 6) y pCGP1919 (Figura 7) se construyen al clonar los casetes de expresión respectivos Mac: Petunia E20: mas 3' y Mac: Petunia E33: mas 3' de los plásmidos pCGP1910 y pCGP1911 dentro del vector binario Ti pWTT2132 (DNAP). Los genes quiméricos de Petunia E20 y E33 se aíslan de pCGP 1910 y pCGP1911 luego de la digestión de endonucleasa de restricción del plásmido con BglII y la saliente 5' resultante se repara utilizando el fragmento Klenow de polimerasa I de ADN. Se purifican los genes quiméricos de Petunia E20 y E33 utilizando un Equipo Bresaclean (Bresatec) y luego se ligan con los extremos Smal desfosforilados del vector binario pWTT2132. La ligación correcta de los fragmentos se establece mediante la digestión de endonucleasa de restricción del ADN de plásmido aislado de los transformantes E. coli resistentes a la tetraciclina. Los plásmidos resultantes se designan pCGP1918 (Figura 6) y pCGP1919 (Figura 7), respectivamente.

Supresión anticodificante de la actividad FMT en P. hybrida

30 Los plásmidos pCGP1918 (Figura 6) y pCGP 1919 (Figura 7) cada uno se introducen en la cepa Agrobacterium tumefaciens AGL0 en forma separada. El T-ADN contenido en los plásmidos pCGP1918 (Figura 6) y en pCGP1919 (Figura 7) se introduce en experimentos separados en P. hybrida cv. VR por medio de la transformación mediada por Agrobacterium.

Análisis transgénico de plantas petunia pCGP1918/VR y pCGP1919/VR

35 Se producen plantas transgénicas independiente y se cultivan hasta florecimiento. Una selección de plantas produce flores con colores rosados oscuros, que difieren al control VR de color púrpura. Una selección de colores de flor observada se muestra en la Tabla 12. Los pigmentos que se acumulan en las flores de las plantas transgénicas se analizan mediante HPLC (Tabla 13).

TABLA 12

Colores de pétalo de flores transgénicas VR, 1918/VR y 1919/VR			
NÚMERO DE ACCESO	VARIEDAD/CONSTRUCCIÓN	CÓDIGO RHSCC	COLOR DE PÉTALO
9339	VR/1918	64C, 67A	rosado oscuro
9724	VR/1918	64B, 67A	rosado oscuro

(continuación)

Colores de pétalo de flores transgénicas VR, 1918/VR y 1919/VR			
NÚMERO DE ACCESO	VARIEDAD/CONSTRUCCIÓN	CÓDIGO RHSCC	COLOR DE PÉTALO
10161	VR/1918	78A	Púrpura
10167	VR/1918	78A	Púrpura
10169	VR/1918	78A	Púrpura
10171	VR/1918	78A	Púrpura
9349	VR/1919	78A	Púrpura
9463	VR/1919	78A	Púrpura
10177	VR/1919	74A	rojo/púrpura
10178	VR/1919	78A	púrpura
10183	VR/1919	78A	Púrpura
12704	control VR	78A	Púrpura
RHSCC = Carta de Color de La Sociedad Hortícola Real (Kew, UK).			

Extracción de antocianidinas

- 5 Antes del análisis HPLC, las moléculas de antocianina y flavonol presentes en los extractos de pétalo y estambres se hidrolizan en ácido para retirar las unidades estructurales de glicosilo del núcleo de antocianidina o flavonol. Se utilizan estándares de antocianidina y flavonol para ayudar a identificar los compuestos presentes en los extractos florales.

- 10 Las antocianidinas en la mezcla de reacción se analizan mediante HPLC por medio de elución de gradiente utilizando condiciones de gradiente de 50 % B a 60 % B durante 10 minutos, luego 60 % B durante 10 minutos y finalmente 60 % B a 100 % B durante 5 minutos cuando el solvente A consiste de TFA: H₂O (5:995) y el solvente B consiste de acetonitrilo: TFA: H₂O (500:5:495). Se utiliza una columna de cartucho Asahi Pac ODP-50 (250 mm x 4.6 mm ID) para las separaciones cromatográficas de fase inversa. El índice de flujo es 1 mL/min y la temperatura es 40° C. La detección de los compuestos antocianidina se lleva a cabo utilizando un detector tridimensional Shimadzu SPD-M6A a 400-650 nm.

- 15 Se identifican picos de antocianidina mediante referencia a los estándares conocidos, viz delfinidina, petunidina, malvidina, cianidina y peonidina.

TABLA 13

Porcentaje de los niveles de antocianidinas detectadas en los pétalos de transgénicos VR/1918 y VR/1919 mediante análisis HPLC							
Acc#	pCGP#	Color	Antocianidina (%)				
			Del	Cia	Pet	Peo	Mal
9724	1918	rosado oscuro	51.7	6.0	34.5	0.0	7.8
10161	1918	púrpura	1.2	0.6	0.6	0.3	97.3
10167	1918	púrpura	0.6	0.2	4.7	0.3	94.2
10169	1918	púrpura	0.4	0.1	4.7	0.3	94.4
10171	1918	púrpura	0.5	0.1	5.4	0.3	93.7
9349	1919	púrpura	0.6	0.0	5.6	0.2	93.6
9463	1919	púrpura	0.8	0.1	7.9	0.3	90.9
10177	1919	rojo-púrpura	36.8	0.0	38.7	0.0	24.5
10178	1919	púrpura	1.2	0.0	14.5	0.2	84.1
10183	1919	púrpura	0.5	0.0	4.4	0.3	94.8
12704 VR	control	púrpura	0.3	0.0	3.8	15.7	80.1

Acc# = Número de acceso de planta,
pCGP# = Número de plásmido,
Del = Delfinidina, expresado como un porcentaje de antocianidinas totales detectadas,
Cia = Cianidina, expresado como un porcentaje de antocianidinas totales detectadas,
Pet = Petunidina, expresado como un porcentaje de antocianidinas totales detectadas,
Peo = Peonidina, expresado como un porcentaje de antocianidinas totales detectadas,
Mal = Malvidina, expresado como un porcentaje de antocianidinas totales detectadas

5 La expresión anticodificante de Petunia E20 (en pCGP1918) y E33 (en pCGP1919) conduce a un cambio en el color de flor de púrpura a rosado oscuro o rojo-púrpura con un cambio concomitante en la composición de antocianina. En general, las flores de petunia de control VR acumulan predominantemente malvidina (el derivado 3', 5' metilado de delfinidina) (alrededor de 80 % de antocianidina total) (Tabla 13). La estirpe transgénica 9724 que contiene el gen de Petunia E20 anticodificante produce flores con un color rosado oscuro con la antocianina predominante que es delfinidina lo que sugiere la expresión del gen E20 anticodificante luego de la actividad metiltransferasa 3' 5'. La estirpe transgénica 10177 que contiene el gen Petunia E33 anticodificante produce flores con un color rojo-púrpura con las antocianinas predominantes que son delfinidina y petunidina lo que sugiere que la expresión del gen E33 anticodificante también impacte luego de una actividad metiltransferasa 3' 5'.

10

EJEMPLO 9

Aislamiento del clon cADN FMT de Torenia

Preparación de una colección de cADN de pétalo de Torenia

5 Se utiliza un equipo λZAPII (EcoRI/XhoI direccional) (Stratagene) para preparar una colección de cADN del ARN aislado de pétalos de brotes abiertos de Torenia hybrida. cv. Summerwave (Suntory Ltd.) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante.

10 Se detectan aproximadamente 200,000 pfus con el clon cADN de Petunia FMT marcado con DIG (E20) de pCGP1907 (Figura 3) utilizando condiciones de baja rigurosidad como se describe por Tanaka et al., (Plant Cell Physiol 37: 711-716, 1996). Se añaden veinte placas hibridadas en PSB. Estas se vuelven a detectar para aislar las placas purificadas, utilizando las condiciones de hibridación como se describe para la detección inicial de la colección de cADN. Los plásmidos contenidos en el vector de bacteriófago λZAPII se rescatan y los datos de secuencia se generan de los extremos 3' y 5' de los insertos de cADN. De estos TFMT representa el clon de cADN más largo (~1 kb) y el plásmido se designa como pTMT5 (Figura 8).

15 La secuencia completa del clon de cADN Torenia FMT (TFMT) [SEQID NO: 11] se determina mediante compilación de la secuencia de diferentes subclones pUC18 utilizando procedimientos estándar para la generación de clones aleatoriamente traslapantes (Sambrook et al., 1989, supra). La secuencia se determina que tiene 1012 bases de longitud y contiene un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido putativo de 240 aminoácidos [SEQ ID NO: 12]. El clon TFMT comparte 50 % de identidad con la secuencia Petunia E20 [SEQ ID NO: 4] en el nivel de nucleótido y 51 % de identidad con la secuencia Petunia E33 [SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 26]. La secuencia de aminoácidos deducida del clon Torenia FMT (TFMT) comparte 56 % de identidad y 70% de similitud en el nivel de aminoácido con aquel del clon Petunia FMT (E20) [SEQ ID NO: 5]. La secuencia de aminoácidos deducida del clon Torenia FMT (TFMT) comparte 69 % de identidad y 82% de similitud en el nivel de aminoácido con aquel del clon FMT de Petunia (E33 corregido) [SEQ ID NO: 7].

Actividad metiltransferasa del Clon de cADN Torenia FMT expresado en E. coli

25 El clon de cADN Torenia FMT (TFMT) también se expresa en un sistema de expresión E. coli (análogo a aquel utilizado en el Ejemplo 7) y se evalúa para actividad FMT.

Clonación de Torenia FMT en el vector de expresión E. coli pQE30 (Construcción de pCGP3090)

Con el fin de clonar el clon de cADN Torenia FMT en un vector de expresión E. coli, pQE30 (QIAGEN), se requiere un sitio de restricción BamHI en ATG de iniciación de traducción y se requiere inmediatamente un sitio de endonucleasa de restricción PstI 3' en el codón de parada putativo.

30 Los oligonucleótidos TMT5.BamHI.F [SEQ ID NO: 13] y TMT5.PstI.R [SEQ ID NO: 14] (Tabla 14) se utilizan como cebadores con pTMT5 como plantilla para amplificar el clon de cADN Torenia FMT con un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BamHI en lugar del AUG de iniciación y un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción PstI inmediatamente 3' en el codón de parada putativo.

35 Las condiciones PCR incluyen 5 µL de regulador de Polimerasa de ADN 10 x PfuTurbo (Stratagene), 2 µL de 10 mM dNTP, 2 µL de 20 µ/µL TMT5.BamHI.F [SEQ ID NO: 13], 2 µL de 20 µ/µL TMT5.PstI.R [SEQ ID NO: 14], 1 µL de 1 µg/µL de plantilla pTMT5, 37 µL de agua pura y 1 µL de Polimerasa de ADN PfuTurbo (Stratagene). El PCR se incubaba a 95° C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos y 72° C durante 1 minuto y luego una incubación final a 72° C durante 10 minutos con almacenamiento posterior a 4° C.

40 TABLA 14

Oligonucleótidos utilizados en la clonación del clon de cADN TFMT en el vector de expresión de bacteriano pQE30		
SEQ ID NO:	CEBADOR	SECUENCIA (5' a 3')
13	TMT5.BamHI.F	GCA TGG ATC CAA AGA TAA GTT CTA TGG CAC CAT TTT G
14	TMT5.PstI.R	GCA TCT GCA GTT ATT TGA GAC GTT TGC ACA AGG TG

Los productos de PCR resultantes se someten a electroforesis a través de 1 % p/v de gel de agarosa y se aísla una banda de 0.72 kb y se purifica utilizando un equipo de Extracción de Gel QIAEX II (QIAGEN) de acuerdo con la recomendación del fabricante. Los productos aislados luego se digieren con el PstI de endonucleasa de restricción. El producto de digestión se purifica utilizando un equipo de purificación PCR QIAquick (QIAGEN) y luego se digiere con el BamHI de endonucleasa de restricción. Los productos digeridos BamHI/PstI se purifican finalmente utilizando un equipo de purificación PCR QIAquick (QIAGEN) y se ligan posteriormente con los extremos BamHI/PstI del vector pQE30 (QIAGEN) utilizando el Equipo de Ligación de ADN (Amersham) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los transformantes se analizan para la presencia del inserto específico 0.72 kb utilizando digestiones de endonucleasa de restricción BamHI/PstI. La secuencia del inserto se confirma mediante el análisis de la secuencia utilizando el Conjunto de Cebador de Secuenciamiento pQE (QIAGEN). El plásmido resultante se designa pCGP3090 (mut-TFMT en pQE30) (Figura 9).

Como una consecuencia de utilizar los oligonucleótidos TMT5.BamHI.F [SEQ ID NO: 13] y TMT5.PstI.R [SEQ ID NO: 14] como cebadores en el PCR y de la clonación posterior del producto en pQE30, la secuencia del clon de Torenia FMT se altera alrededor de la metionina de iniciación putativa del polipéptido codificado. Como una consecuencia los aminoácidos esperados alrededor de la metionina de iniciación putativa se cambian de "M K D K F Y GT" a "MRGSHHHHHGSKDKFYGT".

Para el análisis de la actividad metiltransferasa de la Torenia FMT, el plásmido pCGP3090 se introduce posteriormente en células E. coli M15 (pREP4) (QIAGEN) de acuerdo con el método de Inoue et al., 1990, supra.

La confirmación de la expresión de proteína recombinante y la preparación de extractos de proteína cruda y la determinación posterior de la actividad metiltransferasa son como se describe para el análisis del clon de cADN de Petunia E20 (PFMT) (descrito anteriormente en el Ejemplo 7).

Las actividades de enzima de la proteína codificada por el clon de cADN Torenia FMT en pCGP3090 junto con aquel del clon de Petunia FMT (E20) en pCGP3086 se evalúan utilizando los sustratos 3-glucósido delfinidina y 3-rutinosida delfinidina bajo condiciones de ensayo como se describe en Jonsson et al. (1983), supra y en el Ejemplo 7 de esta especificación.

Se establecen ensayos de metiltransferasa de acuerdo con la Tabla 15 en un volumen de reacción total de 50 µL.

TABLA 15

Composición de los ensayos de metiltransferasa utilizando homogenatos crudos de cultivos bacterianos que contienen los plásmidos pCGP3086 (PFMT) o pCGP3090 (TFMT) o pQE30 (control)						
#	Plásmido	Homogenato crudo (µL)	3 mg/mL de D3R (µL)	3 mg/mL de D3G (µL)	SAM (µL)	Regulador (µL)
1	pQE30	20	5	0	5	20
2	pQE30	20	0	5	5	20
3	pQE30	20	5	0	0	25
4	pQE30	20	0	5	5-25	
5	pQE30	20	0	-	5	25
6	ninguno	0	5	0	5	40
7	ninguno	0	0	5	5	40
8	pCGP3086	20	5	0	5	20
9	pCGP3086	20	0	5	5	20
10	pCGP3086	20	5	0	0	25

ES 2 385 533 T3

(continuación)

Composición de los ensayos de metiltransferasa utilizando homogenatos crudos de cultivos bacterianos que contienen los plásmidos pCGP3086 (PFMT) o pCGP3090 (TFMT) o pQE30 (control)						
#	Plásmido	Homogenato crudo (µL)	3 mg/mL de D3R (µL)	3 mg/mL de D3G (µL)	SAM (µL)	Regulador (µL)
11	pCGP3086	20	0	5	0	25
12	pCGP3090	20	0	5	5	20
13	pCGP3090	20	0	5	0	25

= número de tubo,
D3G = 3-glucósido delfinidina,
D3R = 3-rutinosida delfinidina,
¹⁴C-SAM = 0.6mM ¹⁴C-SAM (13 µCi/mmol) (Amersham Pharmacia),
Regulador = 0.1 M NaPi, pH 7.5, 4 mM MgCl₂

Las condiciones de reacción son como se describió previamente (Ejemplo 7).

TABLA 16

Resultados de ensayos de metiltransferasa de extractos de E. coli que contienen el vector de control pCGP3086, pCGP3090 o pQE30 utilizando 3-glucósido delfinidina o 3- rutinosida delfinidina como sustrato y ¹⁴ C-SAM como donante de metilo							
#	Plásmido	Homogenato crudo	D3R	D3G	SAM	Petunidina	Malvidina
1	pQE30	+	+	-	+	no	no
2	pQE30	+	-	+	+	no	no
3	pQE30	+	+	-	-	no	no
4	pQE30	+	-	+	-	no	no
5	pQE30	+	-	-	+	no	no
6	ninguno	-	+	-	+	no	no
7	ninguno	-	-	+	+	no	no
8	pCGP3086	+	+	-	+	si	si
9	pCGP3086	+	-	+	+	si	si
10	pCGP3086	+	+	-	-	no	no

(continuación)

Resultados de ensayos de metiltransferasa de extractos de E. coli que contienen el vector de control pCGP3086, pCGP3090 o pQE30 utilizando 3-glucósido delfinidina o 3- rutinosida delfinidina como sustrato y ¹⁴ C-SAM como donante de metilo							
#	Plásmido	Homogenato crudo	D3R	D3G	SAM	Petunidina	Malvidina
11	pCGP3086	+	-	+	-	no	no
12	pCGP3090	+	-	+	+	si	si
13	pCGP3090	+	-	+	-	no	no

= Número de tubo,
D3G = 3-glucósido delfinidina,
D3R = 3-rutinosida delfinidina,
¹⁴C-SAM = S-adenosil-L-metionina marcada con ¹⁴C (Amersham Biosciences),
+ = presente en la mezcla de reacción
- = ausente de la mezcla de reacción
si = detección del producto en TLC,
no = no se observa reacción como se determina por la ausencia de producto.

5 Se detectan petunidina y malvidina, los derivados metilados de delfinidina, en las reacciones de ensayo utilizando homogenatos crudos de pCGP3090 (que contiene TFMT) y D3G (Tubo 12, Tabla 15). No existe producción detectable de petunidina y malvidina en las reacciones de ensayo utilizando homogenatos crudos de células pQE30 (Tubos 1 a 5, Tabla 15) o no tiene homogenatos crudos agregados (Tubos 6 y 7, Tabla 15) o en las reacciones de ensayo sin la adición de ¹⁴C-SAM (Tubos 10, 11 y 13, Tabla 15). Los homogenatos crudos de pCGP3086 (que contienen PFMT) se utilizan como controles positivos (Tubos 8 y 9, Tabla 16).

10 Los resultados obtenidos con la expresión del clon de cADN Torenia FMT (TFMT) en un sistema de expresión E. coli proporcionado evidencia adicional que sugiere el clon de cADN TFMT codifica un FMT que es capaz de metilar la 3-glucósido delfinidina utilizando SAM como un donante de metilo para producir el derivado 3' metilado, petunidina y el derivado 3' 5' metilado, malvidina.

EJEMPLO 10

Ensayo HPLC de actividad metiltransferasa de clones de Petunia y Torenia FMT

15 Las actividades de la enzima de los péptidos codificados por Petunia y el clon de cADN Torenia FMT en pCGP3086 y pCGP3090, respectivamente se evalúan adicionalmente utilizando los sustratos 3-glucósido delfinidina y 3-rutinosida delfinidina y 3, 5-diglucósido delfinidina bajo las condiciones de ensayo como se describió previamente (Tabla 15, Ejemplo 9) excepto que el SAM marcado ¹⁴C se reemplaza con SAM no radioactivo a 2 mg/mL y los sustratos (3-glucósido delfinidina y 3-rutinosida delfinidina y 3, 5-diglucósido delfinidina) a 2 mg/mL.

TABLA 17

Identificación de productos (en mg/g) mediante HPLC de ensayos de metiltransferasa de extractos de E. coli que contiene el vector de control pCGP3086, pCGP3090 o pQE30 utilizando 3- glucósido delphinidina, 3-rutinosida delphinidina y 3, 5-diglucósido delphinidina como sustrato y SAM como donante de metilo								
Tubo No.	Sustrato	Plásmido	Antocianidinas (mg/g)					Actividad FMT predominante
			Del	Cia	Pet	Peo	Mal	
1a	D3R	ninguno	17.6	0.6	0	0	0	ninguno
1b			19.9	0.6	0.6	0	0	
2a	D3R	pQE30	16.9	0.6	0.6	0	0	ninguno
2b			21.9	0.6	0.6	0	0	
3a	D3R	pCGP3086	3.7	0.4	10.2	0.2	2.9	3'FMT
3b			4.5	0.5	11.9	0.2	3.6	
4a	D3R	pCGP3090	2.5	0	0.8	0.4	15.6	3'5'FMT
4b			2.8	0	0.8	0.4	15.1	
5a	D3G	ninguno	7.8	1.7	0.9	0	0	ninguno
5b			9.8	1.9	0.9	0	0	
6a	D3G	pQE30	17.1	2.5	1.2	0	0	ninguno
6b			22.1	2.7	1.3	0	0	
7a	D3G	pCGP3086	7.1	2.4	8.8	0.5	1.2	3'FMT
7b			6.4	2.0	10.0	0.6	1.3	
8a	D3G	pCGP3090	1.8	1.0	1.2	2.0	17.1	3'5'FMT
8b			1.9	0.9	1.3	1.9	18.1	
9a	D3,5G	ninguno	4.2	0	0	0	0	ninguno
9b			17.1	0	0	0	0	
10a	D3,5G	pQE30	5.3	0	0	0	0	ninguno
10b			16.0	0	0	0	0	
11a	D3,5G	pCGP3086	2.9	0	2.7	0	0.7	3'FMT
11b			10.5	0.4	6.7	0	1.1	

(continuación)

Identificación de productos (en mg/g) mediante HPLC de ensayos de metiltransferasa de extractos de E. coli que contiene el vector de control pCGP3086, pCGP3090 o pQE30 utilizando 3- glucósido delfinidina, 3- rutinosida delfinidina y 3, 5-diglucósido delfinidina como sustrato y SAM como donante de metilo								
Tubo No.	Sustrato	Plásmido	Antocianidinas (mg/g)					Actividad FMT predominante
			Del	Cia	Pet	Peo	Mal	
12a	D3,5G	pCGP3090	2.4	0	0.7	0	7.3	3'5'FMT
12b			5.4	0	0.8	0	12.4	

Tubo No. = Números de Tubo ("a" y "b" se refiere a mediciones del producto de duplicado)

3'FMT = 3' metiltransferasa flavonoide,
 3'5'FMT = 3' 5' metiltransferasa flavonoide,
 Del = delfinidina,
 Cia = cianidina,
 Pet = petunidina,
 Peo = peonidina,
 Mal = malvidina.

TABLA 18

Productos (expresados como el porcentaje de total de antocianidina) de los ensayos metiltransferasa de extractos de E. coli que contiene el vector de control pCGP3086, pCGP3090 o pQE30 utilizando 3-glucósido delfinidina, 3- rutinosida delfinidina y 3,5-glucósido delfinidina como sustrato y SAM como donante de metilo							
Tubo No.	Sustrato	Plásmido	% de antocianidina detectada				
			Del	Cia	Pet	Peo	Mal
1a	D3R	ninguno	97.0	3.0	0.0	0.0	0.0
1b			94.3	2.7	3.0	0.0	0.0
2a	D3R	pQE30	93.2	3.4	3.4	0.0	0.0
2b			94.7	2.5	2.8	0.0	0.0
3a	D3R	pCGP3086 (PFMT)	21.2	2.5	58.5	1.2	16.6
3b			21.7	2.5	57.4	1.1	17.4
4a	D3R	pCGP3090 (TFMT)	13.2	0.0	4.0	1.9	80.9
4b			14.6	0.0	4.3	1.9	79.1

ES 2 385 533 T3

(continuación)

Productos (expresados como el porcentaje de total de antocianidina) de los ensayos metiltransferasa de extractos de E. coli que contiene el vector de control pCGP3086, pCGP3090 o pQE30 utilizando 3-glucósido delfinidina, 3- rutinosa delfinidina y 3,5-glucósido delfinidina como sustrato y SAM como donante de metilo							
Tubo No.	Sustrato	Plásmido	% de antocianidina detectada				
			Del	Cia	Pet	Peo	Mal
5a	D3G	ninguno	75.3	16.5	8.2	0.0	0.0
5b			77.7	15.2	7.1	0.0	0.0
6a	D3G	pQE30	82.5	12.0	5.6	0.0	0.0
6b			85.0	10.2	4.8	0.0	0.0
7a	D3G	pCGP3086 (PFMT)	35.5	11.8	44.0	2.7	6.0
7b			31.4	9.7	49.4	3.0	6.5
8a	D3G	pCGP3090 (TFMT)	7.8	4.5	5.1	8.5	74.0
8b			7.8	3.6	5.4	8.0	75.2
9a	D3,5G	no	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9b			100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10a	D3,5G	pQE30	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10b			100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11a	D3,5G	pCGP3086 (PFMT)	45.6	0.0	43.4	0.0	11.0
11b			55.9	2.2	35.9	0.0	6.0
12a	D3,5G	pCGP3090	22.9	0.0	7.1	0.0	70.0
12b		(TFMT)	28.9	0.0	4.3	0.0	66.9

Tubo No. = Números de Tubo ("a" y "b" se refiere a mediciones de producto en duplicado)

del = delfinidina, expresado como un porcentaje de antocianidinas totales detectadas,

cia = cianidina, expresado como un porcentaje de antocianidinas totales detectadas,

pet = petunidina, expresado como un porcentaje de antocianidinas totales detectadas,

peo = peonidina, expresado como un porcentaje de antocianidinas totales detectadas,

mal = malvidina, expresado como un porcentaje de antocianidinas totales detectadas.

Bajo las condiciones del ensayo, el clon de cADN de Petunia FMT (E20) contenido en pCGP3086 conduce a una actividad metiltransferasa flavonoide que utiliza 3-glucósido delfinidina, 3-rutinosa delfinidina o 3, 5-diglucósido delfinidina como sustrato para producir predominantemente petunidina y a un grado menor, malvidina.

Los datos previamente publicados en las actividades de metiltransferasa en extractos de proteína cruda de flores de petunia sugiere que las metiltransferasas de Petunia no pueden utilizar 3-glucósido antocianidina o 3-rutinosidas antocianidina como sustratos (Jonsson et al., 1982, supra). Bajo nuestras condiciones de ensayo, sin embargo, la actividad metiltransferasa de Petunia producida por el clon E20 de Petunia en pCGP3086 es capaz de metilar cada 3-glucósido delfinidina, 3-rutinosida delfinidina y 3,5-glucósido delfinidina.

El clon de cADN Torenia FMT contenido en pCGP3090 también resulta en la actividad metiltransferasa flavonoide que utiliza 3-glucósido delfinidina, 3-rutinosida delfinidina y 3, 5-diglucósido delfinidina como sustrato para producir predominantemente malvidina y a un grado menor, petunidina.

EJEMPLO 11

Transformación de rosa para producir pigmentos con base en malvidina.

Las antocianinas predominantes en rosas cultivadas para propósitos comerciales tienden a ser 3-glucósidos o 3,5-diglucósidos de cianidina o pelargonidina (Mikanagi et al., Biochem. System y Ecol. 23: 183-200, 1995, Mikanagi et al., Biochem. System y Ecol. 28: 887-902, 2000). Con el fin de producir pigmentos con base en malvidina en estas rosas, un gen F3'5'H necesitaría ser introducido para producir inicialmente los precursores de pigmentos de malvidina, delfinidina 3-glucósidos o delfinidina 3, 5 diglucósidos. Para luego permitir la conversión a de pigmentos de malvidina, una metiltransferasa flavonoide con actividad 3' y 5' y se puede requerir la capacidad para utilizar 3-glucósidos o 3, 5-diglucósidos de delfinidina.

Por lo tanto, los plásmidos de vector binario pNCGP3254 (Figura 13), pSPB1534 (Figura 15) y pSPB1532 (Figura 18) que contienen un gen quimérico F3'5'H junto con genes de Petunia o Torenia FMT, se construyen para ser introducidos en una rosa para permitir la producción de pigmentos con base en petunidina y/o malvidina y modificar por lo tanto el color de la flor. También se introducen estos plásmidos binarios en una especie que no produce normalmente pigmentos con base en delfinidina y no contiene una metiltransferasa flavonoide capaz de metilar antocianidinas, específicamente delfinidina. Dichas plantas pueden incluir pero no se limitan a clavel, crisantemo, gerbera, orquídeas, Euphorbia, Begonia.

Construcción del vector binario pCGP3254

(35S 5': TFMT: 35S 3'; 35S 5': Viola F3'5'H: 35S 3'; 35S 5': SuRB)

El plásmido pCGP3254 contiene un casete de expresión 35S 5': Viola F3'5'H: 35S 3' (de pCGP2092) (Figura 14) y un casete de expresión 35S 5': Torenia FMT: 35S 3' (de pCGP3099) (Figura 11) en orientación tándem con el gen marcador seleccionable del vector binario Ti pCGP1988 (Figura 12).

(1) Construcción de plásmidos intermedios pCGP3254

(i) Construcción de pCGP3097 (casete de expresión 35S 5': TFMT: 35S 3')

El plásmido pCGP3097 (Figura 10) se construye al clonar el clon Torenia. FMT cADN de pTMT5 en un casete de expresión CaMV 35S.

El plásmido pRTppoptcAFP se utiliza como una fuente de un promotor CaMV 35S y fragmento terminador. Se digiere inicialmente con XbaI, los extremos salientes 5' se reparan y luego se restringe el plásmido con EcoRI para liberar el vector 3.3 kb que contiene el casete de expresión CaMV 35S. El vector 3.3 kb se aísla y purifica.

El pTMT5 se digiere inicialmente con la endonucleasa de restricción Asp718 y se reparan los extremos salientes 5' resultantes. El plásmido lineal luego se restringe con la endonucleasa de restricción EcoRI para liberar el fragmento de cADN Torenia FMT de 1.0 kb que se aísla, purifica, luego se liga con los extremos XbaI (romo)/ EcoRI del vector pRTppoptc (descrito anteriormente). El ligado correcto de los fragmentos se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción (HindIII, ClaI, XhoI, PstI, y SphI) de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a ampicilina. El plásmido resultante se designa pCGP3097 (Figura 10).

(ii) Construcción de pCGP3099 (binario de expresión 35S 5': TFMT: 35S 3'; 35S 5': SuRB)

El plásmido pCGP3099 (Figura 11) se construye al clonar el gen de Torenia FMT quimérico de pCGP3097 (Figura 10) en el vector binario Ti pCGP 1988. El vector binario pCGP1988 (Figura 12) se basa en el vector binario pWTT2132 (ADNP) pero contiene el sitio de multi-clonación de pNEB193 (New England Biolabs).

5 El casete de expresión 35S 5': Torenia FMT: 35S 3' de pCGP3097 (Figura 10) se libera mediante digestión con la endonucleasa de restricción PstI. Un fragmento de 1.66 kb que contiene el gen de Torenia FMT quimérico se aísla posteriormente y se liga con extremos PstI de pCGP1988. El ligado correcto del gen quimérico en tándem con el gen 35S 5': SuRB de pCGP3099 se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción (HindIII, XhoI, PstI, Asp718, EcoRI, y EcoRV) de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a tetraciclina. El plásmido resultante se designa pCGP3099 (Figura 11).

(iii) Construcción de pCGP2092 (casete de expresión 35S 5': Viola F3'5'H (BP#40): 35S 3')

El plásmido pCGP2092 (Figura 14) se construye al clonar el clon cADn F3'5'H aislado de Viola sp. como un fragmento de 1.6 kb de XbaI/EcoRI de pCGP1961 por detrás del promotor CaMV 35S contenido en pRTppoptc.

10 El plásmido pCGP1961 (Solicitudes de Patente Provisional Australiana No. 2002951088 y 2002952835, 2002, supra) se digiere inicialmente con la endonucleasa de restricción Asp718 y se digiere después la reparación de los extremos salientes 5' con la endonucleasa de restricción EcoRI para liberar un fragmento de 1.6 kb que contiene el gen quimérico F3'5'H. El fragmento se aísla y liga extremos de con XbaI (romos)/EcoRI del vector 3.3kb pRTppoptc (descrito anteriormente). El ligado correcto del clon cADN F3'5'H Viola (BP#40) en el casete de expresión CaMV 35S
15 se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción (HindIII, XhoI, PstI) de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a ampicilina. El plásmido resultante se diseña como pCGP2092 (Figura 14).

Construcción de pCGP3254

20 El gen F3'5'H quimérico se libera posteriormente de pCGP2092 mediante restricción con la endonucleasa de restricción PstI seguido por tratamiento con polimerasa de ADN T4 para reparar los extremos salientes 3'. El fragmento se aísla y se liga con los extremos SmaI del pCGP3099 (descrito anteriormente). La inserción correcta del gen quimérico F3'5'H en tándem con el gen 35S 5': SuRB y el gen de casete de expresión 35S 5': Torenia FMT: 35S 3' se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción (HindIII, XhoI, NcoI, Sall, EcoRI, EcoRV) de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a tetraciclina. El plásmido resultante se designa pCGP3254 (Figura 13).

25 Transformación de planta con pCGP3254

El vector binario pCGP3254 (Figura 13) se introduce en una cepa *A. tumefaciens* AGL0 y el T-ADN contenido en pCGP3254 se introduce posteriormente en variedades de rosa Medeo y Sonia a través de transformación mediada por *Agrobacterium*.

(2) Construcción de los vectores binarios

30 (a) pSPB1534 (e35S 5': BP#40: pet D8 3'; e35S 5': PFMT: nos 3') y (b) pSPB1532 (e35S 5': BP#40: pet D8 3'; e35S 5': TFMT: nos 3')

(b) El plásmido de vector binario pSPB1534 (Figura 15) contiene un casete de expresión e35S 5': Viola F3'5'H (BP#40): pet D8 3' (de pSPB580 (Figura 16)) en orientación tándem con un casete de expresión e35S: PFMT: nos 3' (de pSPB1531 (Figura 17)). Ambos genes quiméricos están en una orientación tándem con el casete de gen
35 marcador seleccionable nos 5': nptII: nos 3' del vector binario Ti pBINPlus (van Engelen et al., Transgenic Research, 4: 288-290, 1995).

(b) El plásmido de vector binario pSPB1532 (Figura 18) contiene un casete de expresión e35S 5': Viola F3'5'H (BP#40): pet D8 3' (de pSPB580 (Figura 16)) en orientación tándem con un casete de expresión e35S 5': TFMT: nos 3' (de pSPB1530 (Figura 19)). Ambos genes quiméricos están en una orientación tándem con el casete de gen de
40 marcador seleccionable nos 5': nptII: nos 3' del vector binario Ti pBINPlus (van Engelen et al., 1995, supra).

TABLA 19

Oligonucleótidos utilizados como cebadores en la construcción de los vectores binarios pSPB1534 y pSPB1532		
SEQ ID NO:	NOMBRE	SECUENCIA (5' A 3')
28	petD8 #1	CCC TCG AGT TTC TAT TTT GTG TGT GTT G
29	petD8 #2	GGG AAT TCT AGA GCT CGA GGA TCA CG
30	PMT-F	ACT ACC AAG GAT CCT ACT GAA GCA
31	PMT-R	CTC GAA TGA AGC TTT TGT TA
32	TMT-F	CAT AAA TAG GAT CCG CAG CAG CAA
33	TMT-R	AGT CTC ATA AGC TTC TCT AT

Construcción de plásmidos intermedios pPB1534 y pSPB1532

5 (i) Construcción de pSPB580 (e35S 5': BP#40: pet D8 3')

El plásmido pSPB580 (Figura 16) contiene el clon cADN F3'5'H Viola entre un fragmento de promotor CaMV mejorado (e35S 5') y un fragmento terminador de Petunia PLTP (petD8 3'). (1) Aislamiento del clon F3'5'H de Viola sp.

10 El aislamiento de un clon de cADN F3'5'H de Viola sp. variedad pensamiento negro se ha descrito en la Solicitud de Patente Provisional Australiana Nos. 2002951088 y 2002952835, supra). El plásmido pCGP1961 (Solicitud de Patente Provisional Australiana Nos. 2002951088 y 2002952835, supra) se linealiza luego de digestión con la endonucleasa de restricción BamHI. Un fragmento de ADN de ~1.7 kb que contiene un clon de cADN F3'5'H (BP#40) de Viola sp. cv. pensamiento negro se recupera de la digestión parcial con la endonucleasa de restricción, XhoI.

15 (2) Aislamiento de un fragmento de promotor CaMV 35S mejorado

El vector binario, pBE2113-GUS contiene un gen GUS bajo el control de un promotor CaMV 35S mejorado (e35S 5') con una región terminadora del gen de sintasa nopalina del Agrobacterium (nos 3') (Mitsubishi et al., Plant Cell Physiol. 37: 49-59, 1996). Los plásmidos pBE2113-GUS se digieren con la endonucleasa de restricción SnaBI y un ligador BamHI (5'-GGGATCCC-3') [SEQ ID NO:45] luego se liga con los extremos salientes para producir pBE2113-ΔGUS. Un fragmento de ~0.7 kb que contiene el promotor CaMV 35S mejorado (e35S 5') luego se libera después de digestión de pBE2113-ΔGUS con las endonucleasas de restricción HindIII y BamHI.

(3) Aislamiento de a fragmento terminador del gen de Petunia PLTP (D8) (petD8 3')

25 Un fragmento terminador del gen de proteína de transferencia de fosfolípido de Petunia (PLTP) (petD8 3') (Holton, 1992, supra) se amplifica mediante PCR. Los cebadores pet D8 #1 [SEQ ID NO: 28] (Tabla 19) y pet D8 #2 [SEQ ID NO: 29] (Tabla 19) junto con la plantilla de plásmido pCGP13ΔBam (Holton, 1992, supra) se utilizan para amplificar el fragmento terminador de Petunia PLTP (petD8 3'). El fragmento amplificado de aproximadamente 0.8 kb luego se digiere con las endonucleasas de restricción EcoRI y XhoI.

(4) Construcción de pUCAPAsc- (un vector de clonación lanzadera)

30 El plásmido pUCAP se basa en el vector de clonación pUC19 (NEB) pero contiene un sitio de clonación múltiple extendido (VanEngelen et al., Transgenic Res.4: 288-290, 1995). El pUCAP se digiere con la endonucleasa de restricción PaeI. Los extremos salientes se reparan y luego se ligan con el ligador AscI (5'-GGCGCGCC-3') [SEQ ID NO:46] para producir pUCAPAsc (similar a pUCAP sin un sitio de reconocimiento PaeI y con 2 secuencias de reconocimiento AscI en cualquiera de los extremos del sitio de clonación múltiple).

(5) Construcción de pSPB580 (e35S: BP#40: pet D8 3')

El fragmento BamHI/XhoI de 1.7 kb que contiene el clon de cADN Viola F3'5'H (BP#40) (aislamiento descrito anteriormente) se liga con el fragmento de vector de 2.7 kb de BamHI/EcoRI obtenido de pUCAPAsc (descrito anteriormente) y el fragmento EcoRI/ XhoI que contiene el terminador a Petunia PLTP (petD8 3') (descrito anteriormente). La inserción correcta de los fragmentos se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a ampicilina. El plásmido resultante se designa pSPB51

El fragmento HindIII/BamHI de 0.7 kb que contiene la región promotora CaMV 35S mejorada (descrita anteriormente) se liga con los extremos HindIII/BamHI del plásmido pSPB51. La inserción correcta del fragmento se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a ampicilina. El plásmido resultante se designa pSPB580 (Figura 16).

(ii) Construcción del vector binario pSPB176 (e35S 5': GUS: nos 3'; nos 5': nptII: nos 3')

El vector binario pSPB 176 (Figura 20) contiene un casete de expresión e35S 5': GUS: nos 3' en una orientación tándem al casete de gen marcador seleccionable del vector binario Ti pBINPlus (van Engelen et al., 1995, supra).

El plásmido pBE2113-ΔGUS (descrito anteriormente) se digiere con SacI. Los extremos salientes 3' se reparan y luego se ligan con un ligador Sall (5'-GGTCGACC-3') [SEQ ID NO:47] para producir pBE2113-ΔGUSs. Un fragmento que contiene el casete de expresión e35S 5': GUS: nos 3' se libera del pBE2113-ΔGUSs luego de digestión con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI. El fragmento HindIII/EcoRI luego se liga con los extremos HindIII/EcoRI del vector binario Ti pBinPLUS (VanEngelen et al., 1995, supra). La inserción correcta del fragmento se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a kanamicina. El plásmido resultante se designa pSPB176 (Figura 20).

(iii) Construcción del vector binario intermedio pSPB1531 (e35S 5': PFMT: nos 3'; nos 5': nptII: nos 3')

El plásmido de vector binario pSPB1531 (Figura 17) contiene el clon de cADN de Petunia FMT (con una región de no codificación 5' acortada cuando se compara con el clon E20) entre un fragmento de promotor CaMV mejorado (e35S 5') y un fragmento terminador nos (nos 3') en tándem con el casete de gen marcador seleccionable nos 5': nptII: nos 3' del vector binario Ti pBINPlus (van Engelen et al., 1995, supra).

La región 5' del clon de cADN de Petunia FMT contenida en pCGP1907 (Figura 3) se amplifica mediante PCR utilizando los cebadores PMT-F [SEQ ID NO: 30] y PMT-R [SEQ ID NO: 31] y 10 ng del plásmido pCGP1907 como plantilla. El oligonucleótido PMT-F [SEQ ID NO:30] se diseña para amplificar desde la posición 43-66) de la SEQ ID NO:4 y se incorpora una secuencia de reconocimiento BamHI para fácil clonación. El cebador PMT-R [SEQ ID NO: 31] se diseña para amplificar desde la posición 192-173 de la SEQ ID NO:4 y se incorpora una secuencia de reconocimiento HindIII para facilidad de clonación. El fragmento parcial Petunia FMT 5' amplificado luego se digiere con las endonucleasas de restricción BamHI y HindIII y se liga con el fragmento parcial HindIII/XhoI Petunia FMT 3' de 0.7 kb aislado del plásmido pCGP1907 (Figura 3) y los extremos BamHI/ Sall del vector binario Ti pSPB176 (Figura 20). La inserción correcta de los fragmentos se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a kanamicina. El plásmido resultante se designa pSPB1531 (Figura 17).

(iv) Construcción del vector binario intermedio pSPB1530 (e35S 5': TFMT: nos 3'; nos 5': nptII: nos 3')

El plásmido de vector binario pSPB1530 (Figura 19) contiene el clon de cADN Torenia FMT (con una región de no codificación 5' acortada cuando se compara con el clon TFMT) entre un fragmento de promotor CaMV mejorado (e35S 5') y un fragmento terminador nos (nos 3') en tándem con el casete del gen marcador seleccionable nos 5': nptII: nos 3' del vector binario Ti pBINPlus.

La región 5' del clon de cADN Torenia FMT contenida en pTMT5 se amplifica mediante PCR utilizando los cebadores TMT-F [SEQ ID NO:32] y TMT-R [SEQ ID NO:33] (Tabla 19) y 10 ng de pTMT5 como la plantilla. El oligonucleótido TMT-F [SEQ ID NO:32] (Tabla 19) se diseña para amplificar desde la posición 34-53 de la SEQ ID.NO:11 e incorpora una secuencia de reconocimiento BamHI para facilidad de clonación. El cebador TMT-R [SEQ ID NO: 33] (Tabla 19) se diseña para amplificar desde la posición 214-190 de la SEQ ID NO:11 e incorpora una secuencia de reconocimiento para facilidad de clonación. El fragmento parcial Torenia FMT 5' amplificado luego se digiere con las endonucleasas de restricción BamHI y HindIII y se liga con un fragmento parcial aislado con HindIII/XhoI Torenia FMT 3' de ~0.6 kb de pTMT5 y extremos BamHI/Sall del vector binario Ti pSPB176 (Figura 20). La inserción correcta de los fragmentos se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción de ADN de

plásmido aislado de transformantes resistentes a kanamicina. El plásmido resultante se designa pSPB1530 (Figura 19).

(v) Construcción del vector binario pSPB1534 (e35S 5': BP#40: pet D8 3'; e35S 5': PFMT: nos 3; nos 5': nptII: nos 3')

5 Un fragmento de ADN de ~3.1 kb que contiene el casete de expresión e35S 5': Viola F3'5'H (BP40): pet D8 3' se aísla del plásmido pSPB580 (Figura 16) luego de digestión con la endonucleasa de restricción Ascl. El fragmento purificado se liga con los extremos Ascl del plásmido binario Ti pSPB1531 (Figura 17). La inserción correcta del fragmento en orientación tándem con el casete Petunia FMT y el casete de marcador seleccionable se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a kanamicina. El plásmido resultante se designa pSPB1534 (Figura 15).

10 Transformación de planta con pSPB1534

El plásmido de vector binario pSPB1534 (Figura 15) se introduce en la cepa *A. tumefaciens* AGL0 y el T-ADN contenido en pSPB1534 se introduce en la variedad de rosa híbrida WKS124 a través de la transformación mediada por *Agrobacterium*.

Construcción del vector binario pSPB1532 (e35S5':BP#40:petD83':e35S5':TFMT:nos3':nos5':nptII:nos3')

15 Un fragmento de ADN de ~3.1 kb que contiene el casete e35S: Viola F3'5'H (BP#40): pet D8 3' se aísla del plásmido pSPB580 (Figura 16) luego de digestión con la endonucleasa de restricción Ascl. El fragmento purificado se liga con los extremos Ascl del plásmido binario Ti pSPB 1530 (Figura 19). La inserción correcta del fragmento en una orientación tándem con el casete Torenia FMT y el casete de marcador seleccionable se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a kanamicina. El plásmido resultante se designa pSPB1532 (Figura 18).

Transformación de planta con pSPB1532

El plásmido de vector binario pSPB1532 (Figura 18) se introduce en la cepa *A. tumefaciens* AGL0 y el T-ADN contenido en pSPB1532 se introduce en las variantes híbridas de Rosa Lavanda y WKS124 a través de transformación mediada por *Agrobacterium*.

25 Análisis Transgénico de pétalos de rosa

Se producen y cultivan plantas transgénicas independientes para floración (Tabla 20). El color del pétalo de la flor se mide con el espectrofotómetro CM-2002 (Minolta, J) instalado con el software SpectraMagic (Minolta, Japón) con el fin de obtener su tonalidad y reflectancia (Tablas 21, 22 y 23). La tonalidad (0-360°) es el color básico de un objeto tal como rojo, verde, púrpura, etc., y se define por su posición angular en un espacio de color cilíndrico, o en una Rueda de color. El rojo y azul puros están a 0 y 270 grados, respectivamente. Cuanto más cercano está a la tonalidad está a 270, el color es más azul. La Reflectancia (%) es el porc entaje de luz que se refleja desde un objeto. El espectrofotómetro mide la reflectancia del objeto en varios intervalos a lo largo del espectro visible para determinar la curva espectral del color del objeto. Un bajo valor de reflectancia sugiere un color más oscuro. También se utilizan las Cartas de Color de la Sociedad Hortícola Real (RHSCC) para definir el color de los pétalos (Tablas 21, 22 y 23). Se realizan análisis de transferencia de ARN sobre una selección de flores para confirmar la presencia de los transcritos transgénicos. El análisis HPLC de las antocianidinas que se acumulan en los pétalos de las rosas transgénicas se utiliza para detectar la producción de las antocianinas novedosas, petunidina y malvidina en flores de rosas (Tablas 21, 22 y 23).

TABLA 20

Número de eventos de rosa transgénica independientes de la transformación con T-ADNs contenidos en los plásmidos pCGP3254, pSPB1532 y pSPB1534'						
Variedad	Color	Plásmido	Genes	#	# de florecidas	# col mod
Sonia	Melocotón	pCGP3254	F3'5'H y TFMT	36	8	5
Medeo	Melocotón pálido	pCGP3254	F3'5'H y TFMT	2	0	Na
Lavanda	Rosado	pSPB1532	F3'5'H y TFMT	140	126	30

40

(continuación)

Número de eventos de rosa transgénica independientes de la transformación con T-ADNs contenidos en los plásmidos pCGP3254, pSPB1532 y pSPB1534'						
Varietal	Color	Plásmido	Genes	#	# de florecidas	# col mod
WKS124	Melocotón	pSPB1532	F3'5'H y TFMT	90	75	75
WKS124	Melocotón	pSPB1534	F3'5'H y PFMT	60	48	46
# se refiere al número de eventos transgénicos independientes producidos # floreado se refiere al número de eventos independientes que han florecido a la fecha # col mod se refiere al número de eventos transgénicos independientes que producen flores con un color de pétalo modificado comparado con el control						

5 Las antocianinas de las flores de las rosas transgénicas se extraen y las antocianidinas derivadas de las antocianinas se analizan mediante sistema HPLC como se describe en Fukui et al., (Phytochemistry, 47: 1409-1416, 1998). Se detectan los derivados metilados de delphinidina, malvidina y petunidina en un número de flores de rosas transgénicas con el color de la flor modificado (Tablas 21, 22 y 23). También se detecta la peonidina, el derivado metilado de cianidina en las flores de rosas transgénicas (Tablas 21, 22 y 23).

TABLA 21

Niveles de las antocianidinas detectadas en una selección de flores de los eventos transgénicos independientes de R.hybrid cv. WKS124 transformada con el T-ADN en pSPB1532 que contiene genes quiméricos Viola F3'5'H y Torenia FMT														
	Del	Cya	Pet	Pel	Peo	Mal	Total		ref	DP M	Mal	Metil		Color de pétalo
código	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	Tonalidad	(%)	(%)	(%)	(%)	RHS CC	
5-1	0.22	0.02	0.18	0.07	0.06	0.64	1.19	341.86	3.51	92	57	78	72a	Púrpura
5-2	0.20	0.03	0.18	0.01	0.10	0.80	1.32	341.31	2.32	89	60	82	72a	rojo-púrpura
7-1	0.45	0.07	0.32	0.01	0.14	0.82	1.81	352.50	0.89	88	45	71	61a	rojo-púrpura
7-4	0.22	0.02	0.19	0.00	0.11	1.02	1.56	345.43	1.45	91	65	84	72a	púrpura
12-1	0.13	0.01	0.11	0.00	0.07	0.86	1.18	343.56	1.49	93	73	88	78a	púrpura
12-2	0.14	0.01	0.14	0.00	0.06	1.12	1.47	347.08	0.84	95	76	90	78a	púrpura
12-3	0.22	0.03	0.16	0.00	0.04	0.27	0.72	346.05	2.96	90	37	64	64b	rojo-púrpura
25-1	0.22	0.01	0.19	0.00	0.09	0.83	1.34	345.03	0.79	92	62	83	78a	púrpura

ES 2 385 533 T3

(continuación)

Niveles de las antocianidinas detectadas en una selección de flores de los eventos transgénicos independientes de R.hybrid cv. WKS124 transformada con el T-ADN en pSPB1532 que contiene genes quiméricos Viola F3'5'H y Torenia FMT														
	Del	Cya	Pet	Pel	Peo	Mal	Total		ref	DPM	Mal	Metil		Color de pétalo
código	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	tonalidad	(%)	(%)	(%)	(%)	RHS CC	
25-2	0.25	0.01	0.19	0.00	0.06	1.24	1.3	342.77	0.87	96	71	85	78a	Púrpura
control	0	0.01	0	0.07	0	0	0.08	31.14	30.81	0	0	0	38b	melocotón

Código = el número de acceso de la planta transgénica, Del, Cya, Pet, Pel, Peo, Mal (mg/g) se refiere a la cantidad de la antocianidina específica detectada en mg/g donde Del = delfinidina, Cya = cianidina, Pet = petunidina, Pel = pelargonidina, Peo = peonidina, Mal = malvidin

DPM (%) = delfinidina o sus derivados metilados, petunidina y malvidina expresados como un porcentaje de las antocianidinas detectadas totales

Mal (%) = malvidina expresada como un porcentaje de antocianidinas detectadas totales

Metil (%) = antocianidinas metiladas (petunidina, peonidina, malvidina) expresadas como un porcentaje de antocianidinas detectadas totales

Total = las cantidades totales de antocianidinas detectadas (delfinidina, petunidina, malvidina, cianidina, peonidina, pelargonidina) en mg/g

RHSCC = colores observados descritos de acuerdo con las Cartas de Color de la Sociedad Hortícola Real

tonalidad = describe el color básico en grados según se mide por un espectrómetro con software SpectraMagic (Minolta, Japón)

Ref (%) = describe el porcentaje de luz reflejada según se mide por un espectrómetro con software SpectraMagic (Minolta, Japón)

TABLA 22

Niveles de las antocianidinas detectadas en una selección de flores de eventos transgénicos independientes R. hybrid cv. Lavanda transformada con el T-ADN en pSPB1532 que contiene genes quiméricos Viola F3'5'H y Torenia FMT														
código	Del(mg/g)	Cya(mg/g)	Pet(mg/g)	Pel(mg/g)	Peo(mg/g)	Mal(mg/g)	Total(mg/g)(°)	Tonalidad (°)	ref (%)	DPM (%)	Mal (%)	Metil (%)	RH SC C	Color de pétalo
13-3	0.13	0.03	0.04	0	0.01	0.04	0.25	333.81	19.99	82	15	36	75a	púrpura pálido
13-5	0.09	0.01	0.04	0	0.02	0.17	0.33	333.32	10.44	90	52	70	77b	púrpura oscuro

ES 2 385 533 T3

(continuación)

Niveles de las antocianidinas detectadas en una selección de flores de eventos transgénicos independientes R. hybrid cv. Lavanda transformada con el T-ADN en pSPB1532 que contiene genes quiméricos Viola F3'5'H y Torenia FMT														
código	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pet (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	Mal (mg/g)	Total (mg/g) (°)	Tonalidad (°)	ref (%)	DPM (%)	Mal (%)	Metil (%)	RHS CC	Color de pétalo
17-1	0.11	0.05	0.04	0	0.07	0.09	0.36	344.08	13.07	67	26	57	186b	Rosado
17-2	0.04	0.02	0.02		0.04	0.05	0.17	343.90	17.50	65	30	65	186c	Rosado
24-2	0.02	0.02	0.01	0	0.03	0.03	0.11	333.23	29.49	63	31	66	77d	Púrpura pálido
34-1	0	0.04	0	0	0.08	0	0.12	339.82	17.45	0	0	68	186c	Rosado
Control LA	0	0.08	0	0	0	0	0.08	345.25	16.75	0	0	0	186c	Rosado

Código = el número de acceso de la planta transgénica, Del, Cya, Pet, Pel, Peo, Mal (mg/g) se refiere a la cantidad de la antocianidina específica detectada en mg/g donde Del = delfinidina, Cya = cianidina, Pet = petunidina, Pel = pelargonidina, Peo = peonidina, Mal = malvidina

DPM (%) = delfinidina o sus derivados metilados, petunidina y malvidina expresados como un porcentaje de antocianidinas detectadas totales

Mal (%) = malvidina expresada como un porcentaje de antocianidinas detectadas totales

Metil (%) = antocianidinas metiladas (petunidina, peonidina, malvidina) expresadas como un porcentaje de antocianidinas detectadas totales

Total = las cantidades totales de antocianidinas detectadas (delfinidina, petunidina, malvidina, cianidina, peonidina, pelargonidina) en mg/g

RHSCC = colores observados descritos de acuerdo con las Cartas de Color de la Sociedad Hortícola Real

tonalidad = describe el color básico en grados según se mide por un espectrómetro con software SpectraMagic (Minolta, Japón)

Ref (%) = describe el porcentaje de luz reflejada según se mide por un espectrómetro con software SpectraMagic (Minolta, Japón)

TABLA 23

Niveles de las antocianidinas detectadas en una selección de flores de eventos transgénicos independientes de R. hybrid cv. WKS124 transformada con el T-ADN en pSPB1534 que contine genes quiméricos Viola F3'5'H y Petunia FMT														
código	Del(mg/g)	Cya(mg/g)	Pet(mg/g)	Pel(mg/g)	Peo(mg/g)	Mal(mg/g)	Total(mg/g)	Tonalidad (°)	ref (%)	DPM(%)	Mal (%)	Metil(%)	RHS CC	Color de pétalo
02-2	0.44	0.06	0.01	0.02	0	0	0.53	347.53	10.15	85	0.0	2	64c	rojo-púrpura
02-3	0.59	0.09	0.01	0.01	0	0	0.7	346.64	8.51	85	0.0	2	64c	rojo-púrpura
07-1	0.91	0.10	0.02	0.03	0	0	1.06	352.44	7.26	87	0.0	2	71b	rojo-púrpura
08-3	1.76	0.06	0.03	0.00	0	0	1.85	350.34	1.56	97	0.0	2		rojo-púrpura
08-6	1.34	0.06	0.03	0	0	0	1.43	354.15	1.11	96	0.0	2	61a	rojo-púrpura
08-7	1.22	0.11	0.02	0.01	0	0	1.36	351.48	1.55	92	0.0	2	64b	rojo-púrpura
11-2	1.60	0.17	0.02	0.01	0	0	1.80	357.44	1.14	90	0.0	1	61a	rojo-púrpura
14-3	1.35	0.10	0.03	0.00	0	0	1.48	352.54	2.58	93	0.0	2	64b	rojo-púrpura
14-5	1.11	0.04	0.03	0	0	0	1.18	352.52	1.78	97	0.0	2	64b	rojo-púrpura
15-1	1.04	0.04	0.02	0	0	0	1.10	351.85	1.72	97	0.0	2	64b	rojo-púrpura
15-2	1.25	0.06	0.03	0	0	0	1.34	347.89	3.77	96	0	2	64b	rojo-púrpura
control	0	0.01	0	0.07	0	0	0.08	31.14	30.81	0	0	0	38b	Melocotón

Código = el número de acceso de la planta transgénica, Del, Cya, Pet, Pel, Peo, Mal (mg/g) se refiere a la cantidad de la antocianidina específica detectada en mg/g donde Del = delphinidina, Cya = cianidina, Pet = petunidina, Pel = pelargonidina, Peo = peonidina, Mal = malvidina

DPM (%) = delphinidina o sus derivados metilados, petunidina y malvidina expresados como un porcentaje de antocianidinas detectadas totales

Mal (%) = malvidina expresada como un porcentaje de antocianidinas detectadas totales

Metil (%) = antocianidinas metiladas (petunidina, peonidina, malvidina) expresadas como un porcentaje de antocianidinas detectadas totales

Total = las cantidades totales de antocianidinas detectadas (delphinidina, petunidina, malvidina, cianidina, peonidina, pelargonidina) en mg/g

RHS CC = colores observados descritos de acuerdo con las Cartas de Color de la Sociedad Hortícola Real

Tonalidad = describe el color básico en grados según se mide por un espectómetro con software SpectraMagic (Minolta, Japón)

Ref (%) = describe el porcentaje de luz reflejada según se mide por un espectómetro con software SpectraMagic (Minolta, Japón)

Análisis de Transferencia de ARN

Las flores de 7 plantas WKS124/pSPB1532 transgénicas (estirpes 5-1, 5-2, 7-1, 7-4, 12-1, 12-3) y 7 plantas Lavanda/1532 (estirpes 13-2, 13-3, 13-5, 17-1, 24-2, 34-1) junto con flores de controles WKS124 y Lavanda no transgénicos se analizan para la presencia de transcritos de los genes *Viola F3'5'H* y *Torenia FMT* trans introducidos.

Se aísla ARN total de pétalos de rosa transgénicos utilizando RNeasy (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Veinte mg de ARN se separa a través de 1.2% de gel de agarosa y se transfiere a Hybond-N (Amersham) siguiendo el Manual de Instrucción del equipo DIG Northern Starter (Roche). Las ARN que se hibridan con mARN de *Viola F3'5'H* (BP#40) y *Torenia FMT* se preparan utilizando los plásmidos, pCGP1961 (que contienen clon de cADN *Viola F3'5'H* (BP#40)) (Solicitud de Patente Provisional Australianas No. 2002951088 y 2002952835, 2002, supra) y pTMT5 (Figura 8) que ha sido digerida con la endonucleasa de restricción BamHI, como la plantilla de transcripción y el oligonucleótido T7 como el cebador de transcripción siguiendo el Manual de Instrucción del equipo DIG Northern Starter (Roche). También se lleva a cabo hibridación adicional y detección siguiendo el Manual de Instrucción del equipo DIG Northern Starter (Roche).

Bajo las condiciones utilizadas, se detectan transcritos de ~1.7kb con la sonda *Viola F3'5'H* en la mayoría de las estirpes 34-1 (Lavanda/pSPB1532). Se detecta un transcrito de ~1.0 kb con la sonda TFMT en todas las 14 líneas transgénicas analizadas. Bajo las condiciones utilizadas, se detectan transcritos que no hibridizan en los pétalos de control de WKS124 y Lavanda con las sondas *Viola F3'5'H* y TFMT.

Rosas transgénicas WKS124

La variedad rosa WKS124 generalmente produce flores de melocotón (RHSCC 38b). El análisis HPLC de las antocianidinas revelan que la pelargonidina (0.07 mg/g de pelargonidina) es la antocianidina predominante que se acumula con bajos niveles de cianidina también presente (0.01 mg/g cianidina) (Tabla 21).

La introducción del gen quimérico *Viola F3'5'H* junto con la *Torenia FMT* tiene un impacto dramático sobre el color de las flores producidas y sobre la composición de antocianidina en los pétalos. En una selección de pétalos con el cambio de color más dramático, los pigmentos 3'5' hidroxilados (delfinidina, petunidina y malvidina) predominan, con la malvidina que es la antocianina más predominante (Tabla 21).

La introducción del gen quimérico *Viola F3'5'H* junto con la *Petunia FMT* lleva a la producción de la antocianidina 3'5' hidroxilatada, delfinidina en una selección de pétalos de rosa. La actividad de la *Viola F3'5'H* introducida lleva la producción de relativamente altos niveles de delfinidina (Tabla 23). Sin embargo la actividad resultante de la *Petunia FMT* introducida en los pétalos de rosa WKS124 es baja y solo se acumula una pequeña cantidad de la antocianidina metilada, petunidina (Tabla 23). Puede ser que las condiciones fisiológicas dentro de los pétalos de rosa WKS124 no sean ideales para que la *Petunia FMT* trabaje de forma eficiente.

La producción predominante de pigmentos de delfinidina en un fondo de pétalo WKS124 (WKS124/pSPB1534) lleva a un incremento en las antocianidinas totales producidas (de 0.08 mg/g en las flores de control a 0.5-1.9 mg/g en las flores transgénicas). Esta producción predominante de pigmentos de delfinidina en los pétalos WKS124 resulta en un cambio de color de melocotón (flor de control) a colores en los rangos de rosado oscuro a rojo-púrpura (Tabla 23). Se observa un incremento similar en las antocianidinas totales en los pétalos WKS124/pSPB1532 transgénicos (Tabla 21). Sin embargo, la delfinidina producida se convierte a la petunidina metilada y los pigmentos con base en malvidina y esto lleva a un azulamiento adicional del color de la flor en el rango de colores, lo que resulta en flores de rosas de color novedoso.

Los valores de tonalidad de los pétalos WKS124/1532 son generalmente más cercanos que aquellos de los pétalos WKS/1534 a 270 lo que indica que la producción de malvidina o metilación de antocianinas contribuye al azulamiento del color de la flor. En otras palabras, los genes FMT son útiles para modificar el color de las flores, especialmente, pero no limitado, hacia azul.

Los valores de reflectancia de los pétalos WKS 124/1532 son de manera general más bajos que aquellos de los pétalos de WKS/1534, que indican que la producción de malvidina o metilación de antocianinas contribuye al oscurecimiento del color de la flor. En otras palabras, los genes FMT son útiles para modificar el color de las flores, especialmente, pero no se limita, hacia color más oscuro. Además, con estos cambios de color de la flor, las estirpes WKS124/1532 que acumulan grandes cantidades de malvidina tienen apariencia más viva y brillante. Dicha modificación de color de la flor también se exhibe mediante cambios de RHSCC. Estos resultados demuestran claramente que los genes FMT son útiles para modificar el color de la flor.

Rosas transgénicas Lavanda

La variedad de rosa lavanda de manera general produce flores rosadas (RHSCC 186c). El análisis HPLC de las antocianidinas revela que la cianidina (0.08 mg/g cianidina) es la antocianidina de acumulación predominante (Tabla 22).

5 La introducción del gen quimérico *Viola F3'5'H* junto con la *Torenia FMT* tiene un impacto dramático sobre el color de las flores Lavanda Transgénicas producidas y sobre la composición de antocianidina en los pétalos. En una selección de pétalos con el cambio de color más dramático, los pigmentos 3'5' hidroxilatados (delfinidina, petunidina y malvidina) predominantes, siendo la malvidina la antocianina más predominante (Tabla 22).

10 La introducción de los genes *Viola F3'5'H* y *Torenia FMT* en la Lavanda llevan a un incremento en el nivel total de acumulación de antocianidinas en los pétalos de rosa (de 0.08 mg/g en las flores de control a 0.11-0.36 mg/g en las transgénicas) (Tabla 22).

En este fondo de pétalo se observa el cambio de color más dramático y el cambio a azul (a color púrpura 77b) en una flor que contiene un alta proporción (90% de sus antocianidinas totales) de pigmentos con base en delfinidina (delfinidina, petunidina y malvidina) con 52% de la acumulación de antocianidinas totales que son malvidina.

15 En la estirpe 34-1 (Tabla 22), no se produce delfinidina lo que indica la ausencia de actividad del gen *F3'5'H* introducido. El análisis de transferencia de ARN revela que no se hibrida el transcrito *Viola F3'5'H* en esta línea. Sin embargo, se detecta un transcrito *Torenia FMT* que se hibrida fuertemente y se confirma la actividad de *Torenia FMT* mediante la producción de peonidina (el derivado metilado de cianidina). Este resultado pone en relieve que la *Torenia FMT* también es capaz de mutar pigmentos con base en cianidina.

EJEMPLO 12

20 Aislamiento de clones de cADN FMT de *Fuchsia* spp

PCR de secuencias FMT de *Fuchsia*

Diseño CODEHOP de cebadores para PCR de secuencias FMT de *Fuchsia*

25 Con el fin de aislar las secuencias FMT de *Fuchsia*, se diseñan cebadores de oligonucleótido para áreas de similitud de secuencia de aminoácidos entre *Petunia FMT* (esta especificación) y (base de datos GenBank) cafeolilo CoA OMTs publicado (*V. vinifera* (Z54233), *S. longipes* (L22203), *P. tremuloides* (U27116), *P. kitakamiensis* (AB00048), *P. crispum* (Z54183), *E. gunnii* (Y12228), *N. tabacum* (U38612), *M. crystallinum* (AF053553), *A. thaliana* (L40031)).

30 Se utiliza la estrategia CODEHOP (Cebadores de Oligonucleótido Híbrido DEgenerado de CONsensus) (Rose et al., Nucl Acids Res, 26: 1628-1635, 1998) (indicado en <http://blocks.fhcrc.org/CODEHOP.html>). El programa CODEHOP diseña un grupo de cebadores que contienen todos los posibles 11 o 12-meros para una región de "núcleo" degenerado y que tiene el nucleótido predicho más probable para cada posición en una región "abrazadera" 5' no degenerada (Tabla 24).

TABLA 24

Oligonucleótidos diseñados para áreas de similitud de secuencia entre secuencias de metiltransferasa identificadas por el programa CODEHOP		
SEQ ID NO:	CEBADOR	SECUENCIA (5' TO 3')
15	OMTI _f 2	ACC ATC GAG ATC GGC GTN TTY CAN GG
16	OMTI _f 4	CGA CTT CGC CTT CGT GGA YGC NGA YAA
17	OMTI _r 3	TGA AGT TGA TCT TGT GCT CCA CNC CNG CYT T
18	OMTI _r 5	CGC CGG CAG AAG GTG ANN CCR TCN CC

donde R=A o G, Y=C o T, M=A o C, K=G o T, S=G o C, W=A o T, H=A o C o T, B=G o C o T, V=A o G o C, D=A o G o T, N=A o G o C o T, I= desoxinosina.

TABLA 25

Otros oligonucleótidos diseñados para uso en PCR de secuencias FMT		
SEQ ID NO:	CEBADOR	SECUENCIA (5' TO 3')
19	dT(17)Ad2Ad1	CTG AGA GAA CTA GTC TCG AGC TCT AGA ACA AGC TTT TTT TTT TTT
20	GI-ancla	GGC CAC GCG TCG ACTIVIDAD AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG
27	Ad1	CTG AGA GAA CTA GTC TCC AG
I= desoxinosina.		

5 El ARN Total se aísla de brotes de pétalo Fuchsia que utilizan el equipo Plant RNAeasy (QIAGEN). Se utiliza un microgramo de ARN como una plantilla para sintetizar el cADN que utiliza Superscript II (Stratagene) y el oligonucleótido dT(17)Ad2Ad1 [SEQ ID NO: 19] (Tabla 25) bajo condiciones como se recomienda por el fabricante. Se purifica el cADN al pasarlo a través de una columna de purificación PCR (QIAGEN) y al eluirlo en 50 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8.5. El cADN se lleva posteriormente al terminal C utilizando transferasa terminal de Timo de Becerro (Boehringer Mannheim) utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. El cADN en terminal C
10 luego se purifica a través de una columna de purificación de PCR (QIAGEN) y se eluye en 50 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8.5.

15 El cADN de terminal C (1 mL) se utiliza posteriormente como plantilla en un PCR con 2.5 mL de regulador Taq QIAGEN, 4 mL de dNTP 1.25 mM, 5 mL 50 ng/mL de cebador OMTIf2 [SEQ ID NO: 15], 5 mL 50 ng/mL de cebador Ad1 [SEQ ID NO: 27] (Tabla 25), 2 mL de agua pura y 0.5 mL de polimerasa ADN Tag HotSTAR (marca) (QIAGEN). La reacción se calienta a 95° C durante 15 minutos luego se corre a 35 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 50° C durante 30 segundos, 72° C durante 90 segundos, seguido por 72° C durante 10 minutos.

20 Los productos PCR se someten a electroforesis a través de 1% p/v de gel de agarosa y se cortan los productos esperados con una longitud de alrededor de 0.8 kb, se purifican y se ligan con pCR 2.1 (Invitrogen). Se analiza una selección aleatoria de transformantes para la presencia de insertos al digerir con la endonucleasa de restricción EcoRI. Los transformantes que contienen insertos de 0.8 kb se secuencian utilizando los cebadores Inverso M13 y Directo M13 -21. Un ejemplo de las secuencias Fuchsia resultantes que muestran similitud con FMTs se encuentra en el plásmido designado pCGP3267 (Figura 21).

25 El Fuchsia FMT (SEQ ID NO: 21) contenido en el pCGP3267 muestra 66% y 64% de identidad en el nivel de nucleótido con la Petunia [SEQ ID NO:4] y Torenia FMT [SEQ ID NO:11] cuando se compara con solo la secuencia de codificación correspondiente con la longitud del clon Fuchsia FMT parcial. Las secuencias de aminoácido codificadas por el clon Fuchsia FMT en pCGP3267 muestran 81% de similitud con Petunia [SEQ ID NO:5] y Torenia FMT [SEQ ID NO:12] de nuevo considerando solo la región comparable a la longitud del clon Fuchsia parcial.

Generación de clon Fuchsia FMT de longitud completa

30 Se emplea una estrategia genómica para generar secuencias en dirección 5' del clon de cADN Fuchsia FMT [SEQ ID NO: 21] contenido en el plásmido pCGP3267 (Figura 21).

Aislamiento de ADN de Fuchsia

Construcción de librería genómica de Plásmido

35 Se extrae ADN genómico (gADN) de 1 g de material de hoja joven, fresca de Fuchsia hybrid variedad Derby Imp utilizando el equipo Qiagen DNeasy maxi y siguiendo las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 1.2 mg de gADN luego se digiere con la endonucleasa de restricción, TaqI. Los fragmentos de ADN genómicos digeridos luego se ligan (utilizando equipo de ligado Amersham) con extremos dEcoRV desfosforilados del vector pBluescript II (Stratagene). La mezcla de ligado luego se utiliza como una plantilla en PCR.

El cebador OMTIf1 [SEQ ID NO: 23] junto con el cebador FucR1 [SEQ ID NO: 34] (Tabla 26) que se diseña para el clon de cADN Fuchsia FMT contenido en pCGP3267 se utilizan en un PCR utilizando ADN genómico Fuchsia ADN como plantilla. Los productos amplificados se purifican y ligan en el vector pCR2.1. El análisis de secuencia de un fragmento de 274 bp (designado como el "fragmento amplificado OMTIf1/FucR1") revela que este fragmento incluye 51 bp de secuencia traslapante con el clon de cADN Fuchsia FMT en el plásmido pCGP3267, 74 bp adicionales de nueva secuencia de codificación en dirección 5' de este punto, un intrón que tiene 88 bp en longitud y 61 bp adicionales de nueva secuencia de codificación en dirección 5' del intrón.

Adicionalmente a esto una combinación de par de cebador anidado (FucR5 [SEQ ID NO:36] y FucR6 [SEQ ID NO:37] luego se diseña para la secuencia que está en dirección 5' del intrón. Los cebadores FucR5 [SEQ ID NO:36] y FucR6 [SEQ ID NO:37] se utilizan en gADN Fuchsia que se ha digerido con la endonucleasa de restricción, TaqI. Los productos que se amplifican se ligan con los extremos AccI del vector pBluescript KS (Stratagene). Una primera ronda de amplificación por PCR se realiza utilizando los cebadores FucR5 [SEQ ID NO:36] y M13rev (NEB) y gADN Fuchsia como plantilla. Los productos se purifican utilizando una columna Qiaquick (QIAGEN) y luego se agregan como plantilla las segundas rondas de amplificación de PCR con los cebadores FucR6 [SEQ ID NO:36] y T3 (Stratagene). Los productos amplificados se purifican y se ligan en el vector pCR2.1. El análisis de secuencia de un fragmento de 247 bp (designado como el "fragmento amplificado FucR6/T3") revela 24 bp adicionales de la nueva secuencia de codificación en dirección 5' de aquella obtenida con el "fragmento amplificado OMTIf1/FucR1". El resto de la secuencia consiste de otro intrón que tiene 223 bp en longitud y no se puede identificar la dirección 5' de la secuencia de codificación. Se requieren 51 a 54 bp adicionales de secuencia (es decir 17 o 18 aminoácidos) para alcanzar el inicio presumido de metionina como se determina mediante la comparación con las secuencias Torenia y Petunia FMT. Por lo tanto, se desarrolla una estrategia para utilizar la secuencia 5' del clon de cADN Torenia FMT y ligarlo con el producto PCR Fuchsia FMT más largo para generar un clon de cADN Fuchsia FMT cADN funcional y de longitud completa.

Un cebador (FucF1) [SEQ ID NO:38] se diseña para el extremo 5' de la secuencia de codificación encontrada en el fragmento amplificado FucR6/T3 (descrito anteriormente). El cebador FucF1 [SEQ ID NO:38] y el cebador Ad1 [SEQ ID NO:27] se utilizan en un PCR con cADN Fuchsia como plantilla (síntesis de cADN Fuchsia descrita anteriormente). Se clona el producto amplificado en pCR2.1 y el plásmido resultante se designa pCGP3282. El plásmido pCGP3282 se utiliza como plantilla en un PCR con los cebadores Ad1 [SEQ ID NO:27] y Tor-5'pos [SEQ ID NO: 39] y la polimerasa de ADN Taq HotSTAR taq (QIAGEN). El uso de la polimerasa ADN Taq, HotSTAR taq (QIAGEN) deja una saliente 3'-A en el producto amplificado. El producto amplificado resultante (definido como "fragmento amplificado Tor-5' pos/Ad1") luego se digiere con la endonucleasa de restricción, SpeI. (una secuencia de reconocimiento SpeI se ubica dentro del cebador Ad1 en el extremo 3' del clon cADN).

Los cebadores Tor-5'pos [SEQ ID NO:39] y Tor-5'neg [SEQ ID NO:40] se hibridan juntos después de incubación a 75° C durante 5 minutos, seguido por un enfriamiento lento a 37° C durante 30 minutos. Estos cebadores se diseñan de tal manera que una vez hibridados podrían ser una saliente "T" en el extremo 3' de la secuencia, y la saliente de secuencia compatible con una secuencia de reconocimiento EcoRI en el extremo 5'. El oligonucleótido hibridado se liga con los extremos SpeI del "fragmento amplificado Tor-5' pos/Ad1". Estos productos ligados luego se utilizan como plantilla en un PCR utilizando los oligonucleótidos Tor-5'pos [SEQ ID NO:39] y Ad1

[SEQ ID NO:27] como cebadores. El producto PCR luego se liga con el vector de clonación pCR2.1. El plásmido resultante se designa pCGP3289 (Figura 22).

El Fuchsia FMT [SEQ ID NO: 43] contenido en pCGP3289 muestra 51 %, 48% y 56% de identidad en el nivel de nucleótido con Petunia E20 [SEQ ID NO:4], Petunia E33 [SEQ ID NO:26] y Torenia FMT [SEQ ID NO: 11], respectivamente. La secuencia de aminoácidos codificada deducida por el clon Fuchsia FMT en pCGP3289 [SEQ ID NO:44] muestra 67%, 80% y 82% de similitud con Petunia E20 [SEQ ID NO:5], Petunia E33 [SEQ ID NO:7] y Torenia FMT [SEQ ID NO: 12], respectivamente.

TABLA 26

Cebadores		
SEQ ID NO:	NOMBRE	SECUENCIA 5' A 3'
34	FucR1	GCA AGT GCA GTG CAA AGA AGA G
35	FucR3	GAT CTT ATG TTC CAC TCC GC
36	FucR5	GAG AGA TCT GAC CAG TAA GG

(continuación)

Cebadores		
SEQ ID NO:	NOMBRE	SECUENCIA 5' A 3'
37	FucR6	GGA TAT TTT TCG GCC GTG ACC TCC
38	FucF1	ATC TTA GAG ACG ACTIVIDAD GCT TAT CCC
39	Tor-5'pop	AAT TCG CAG CAA AAA TGA AAG ATA AGT TCT ATG GCA CCA TTT TGC AGA GCG AAG CCC TCG CAA AGT AT
40	Tor-5'neg	TAC TTT GCG AGG GCT TCG CTC TGC AAA ATG GTG CCA TAG AAC TTA TCT TTC ATT TTT GCT GCG

Construcción de pCGP3292 (vector binario 35S 5': FFMT: 35S 3'; 35S 5': Viola F3'5'H: 35S 3'; 35S 5': SuRB)

5 El plásmido binario pCGP3292 (Figura 25) se construye para permitir la producción de derivados de delfinidina metilados tales como petunidina y malvidina en una estirpe que normalmente no produce pigmentos con base en delfinidina y no contiene una metiltransferasa flavonoide capaz de metilar antocianinas con base en delfinidina.

El plásmido binario pCGP3292 (Figura 25) contiene un casete de expresión 35S 5': FFMT: 35S 3' (del plásmido pCGP3290 (Figura 23)) y un casete de expresión 35S 5': Viola F3'5 'H: 35 3', ambos en tándem con el casete marcador seleccionable 35S 5': SuRB del vector binario Ti de pCGP1988 (Figura 12).

10 Construcción de plásmidos intermedios

(i) Construcción de pCGP3290 (casete de expresión 35S 5': FFMT: 35S 3')

El plásmido pCGP3290 (Figura 23) se construye al clonar el clon de cADN Fuchsia FMT (FFMT) de pCGP3289 (Figura 22) en un casete de expresión CaMV 35S.

15 El plásmido pRTppoptcAFP se utiliza como una fuente de un promotor CaMV 35S y fragmentos terminadores. Se digiere inicialmente con la endonucleasa de restricción XbaI, los extremos salientes 5' se reparan y luego el plásmido se digiere con la endonucleasa de restricción EcoRI para liberar el vector 3.3 kb que contiene el casete de expresión CaMV 35S. El fragmento de 3.3 kb se aísla y se purifica.

20 El plásmido pCGP3289 (Figura 22) se digiere inicialmente con la endonucleasa de restricción SpeI y los extremos salientes 5' resultantes se reparan. El plásmido lineal luego se restringe con la endonucleasa de restricción EcoRI para liberar un fragmento de cADN Fuchsia FMT de 1.0 kb que se aísla, purifica y luego se liga con los extremos XbaI (romos)/EcoRI del vector pRTppoptc (descrito anteriormente). El ligado correcto de los fragmentos se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción (HindIII, XhoI, y PstI,) de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a ampicilina. El plásmido resultante se designa pCGP3290 (Figura 23).

(ii) Construcción de pCGP2788 (vector binario 35S 5': Viola F3'5'H: 35S 3'; 35S 5': SuRB)

25 El plásmido binario pCGP2788 (Figura 24) contiene el casete de expresión 35S 5': Viola F3'5'H: 35S 3' (de pCGP3254 (Figura 13) en tándem con el casete de marcador seleccionable 35S 5': SuRB del plásmido binario Ti pCGP1988 (Figura 12).

30 El plásmido binario pCGP3254 (Figura 13) se digiere con la endonucleasa de restricción PstI para liberar el casete de expresión 35S 5': Torenia FMT: 35S 3' y la cadena principal del vector binario de expresión. Los fragmentos resultantes se precipitan con etanol (Sambrook et al., 1989, supra) y se vuelve a ligar la mezcla de fragmentos. El ligado correcto de la cadena principal del vector que contiene el gen 35S 5': SuRB y el gen Viola F3'5'H quimérico son el casete 35S 5': Torenia FMT: 35S 3' se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción (HindIII, EcoRV, PstI, EcoRI, y NcoI) de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a tetraciclina. El plásmido resultante se designa pCGP2788 (Figura 24).

35 Construcción de pCGP3292 (expresión binaria 35S 5': FFMT: 35S 3'; 35S 5': Viola F3'5'H: 35S 3'; 35S 5': SuRB)

El plásmido pCGP3292 (Figura 25) se construye al clonar el gen Fuchsia FMT quimérico de pCGP3290 (Figura 23) en el vector binario Ti pCGP2788 (Figura 24).

5 El casete de expresión 35S 5' : FFMT: 35S 3' de pCGP3290 (Figura 23) se libera luego de digestión con la endonucleasa de restricción PstI. Un fragmento de 1.66 kb que contiene el gen Fuchsia FMT quimérico se aísla posteriormente y se liga con extremos PstI del vector binario, pCGP2788 (Figura 24). El ligado correcto del gen quimérico en tándem con el gen 35S 5': SuRB y el gen F3%'H quimérico de pCGP2788 se establece mediante análisis de endonucleasa de restricción (HindIII, XhoI, PstI, EcoRI, y NcoI) de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a tetraciclina. El plásmido resultante se designa pCGP3292 (Figura 25).

Transformación de planta con pCGP3292

10 El plásmido de vector binario pCGP3292 se introduce en la cepa *A. tumefaciens* AGL0 y el T-ADN contenido en pCGP3292 se introduce en *Rosa hybrida* a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* para producir pigmentos con base en petunidina y malvidina y llevar a modificaciones de color de flor (como se detalla en el Ejemplo 11)

EJEMPLO 13

15 Dendograma de metiltransferasas de planta

Un dendograma se construye utilizando el software de paquete ClustalW (Thompson et al., 1994, supra) (Figura 26). Se alinean las secuencias de aminoácido deducidas de *Petunia* (pCGP1907.aa), *Torenia* (pTMT5.aa) y *Fuchsia* (pCGP3267.aa) FMTs con otras O-metiltransferasas de planta de longitud completa de la Clase I y Clase II encontradas en la base de datos GenBank. El dendograma (Figura 26) muestra la relación de agrupación entre estas secuencias. Se agrupan todas las secuencias de la Clase I SAM-OMT juntas debido a su nivel general de similitud de secuencia. Las secuencias *Petunia*, *Torenia* y *Fuchsia* FMT reagrupan con los SAM-OMT de Clase I. Sin embargo, se apartan del grupo principal. Esto indica que estas secuencias se relacionan entre sí pero comparten un nivel inferior de identidad y similitud de secuencia con otros 5 SAM-OMT dentro de esta clase. Todos los otros SAM-OMT de Clase I se han identificado como CCoAOMTs ya sea al probar la actividad de enzima correspondiente con sustratos fenilpropanoides activados con CoA derivados de ácido cafeico, o mediante similitud de secuencia con entradas de bases de datos. Las secuencias de *A. thaliana* CCoAOMT (GenBank L40031) y *Populus kitaka-miensis* CCoAOMT (GenBank AB000408) se encuentran en un grupo adyacente a aquellos de los FMT descritos aquí. Estas secuencias son más similares a los FMT que a otros a CCoAOMTs. Sin embargo, no existe evidencia experimental para estos 10 clones con respecto actividad enzima o sustratos que se metilan. Se forman las ramificaciones restantes del dendograma por agrupamientos de los SAM-OMT de Clase II. Estos incluyen COMTs (ácido cafeico OMTs), F3'OMT (flavonoide 3'-OMT; Gauthier et al., 1996, supra), IOMTs (isoflavona OMTs; He y Dixon, 1998, supra), 2'OMTs (isoliquiritigenina 2'-OMT; Maxwell et al., 1993, supra), IMT (inositol OMT; Rammesmeyer et al., 1995, supra), y F7OMT (flavonoide 7-OMT; Christensen et al., 1998, supra), entre otros. Dada la variedad de sustratos utilizados por los miembros de los SAM-15 OMT de Clase II, y la capacidad de algunas de estas proteínas para actuar en los compuestos flavonoides que se relacionan estructuralmente con las antocianinas, es inesperado que los FMT aislados de *Petunia*, *Torenia* y *Fuchsia* no caigan en esta categoría de SAM-OMTs. Los comentarios en la bibliografía (Ibrahim y Muzac, 2000, supra; Schroder et al., *Phytochemistry*, 59: 1-8, 2002) han sugerido que las metiltransferasas que actúan en los flavonoides y específicamente en las antocianinas caerían en los SAM-OMT de Clase II. Sorprendentemente la secuencias FMT descrita en esta especificación se parece a los CCoAOMT en la Clase 20 I más cercanamente que los miembros de los SAM-OMT de Clase II. Los CCoAOMT se conocen por solo utilizar de forma eficiente un par de sustratos activados con CoA, cafeoil-CoA (CCoA) y 5-hidroxiferuloil-CoA (HFCoA). Estos compuestos fenilpropanoides se derivan directamente del ácido cafeico (CA) y el a'c 5-hidroxiferúlico (HFA) que se utilizan de forma eficiente por las proteínas COMT de los SAM-OMT de la Clase II. La estructura de anillo básica de estos flavonoides y antocianinas es similar, la principal diferencia con las antocianinas es la presencia de azúcar y grupos secundarios acilo que forman adiciones voluminosas a la molécula. Se cree que estos grupos pueden imponer diferentes requerimientos estéricos a las enzimas involucradas en la modificación de antocianinas comparada con, por ejemplo, moléculas de flavanona e isoflavonoide. Así, con respecto a los compuestos de antocianina el azúcar y los grupos secundarios acilo pueden imitar el grupo CoA grande adjunto a estas moléculas imponiendo un requerimiento estérico similar en las proteínas SAM-OMT que actúan sobre ellas

50 EJEMPLO 14

Aislamiento de cADNs FMT de otras especies

Las antocianinas metiladas tales como pero no limitadas a peonidina, petunidina y malvidina se producen en *Petunia* sp., *Plumbago* sp., *Vitis* sp., *Babiana stricta*, *Pinus* sp., *Picea* sp., *Larix* sp., *Phaseolus* sp., *Solanum* sp., *Vaccinium* sp., *Cyclamen* sp., *Iris* sp., *Pelargonium* sp., *Geranium* sp., *Pisum* sp., *Lathyrus* sp., *Clitoria* sp., *Catharanthus* sp.,
55 *Malvia* sp., *Mucuna* sp., *Vicia* sp., *Saintpaulia* sp., *Lagerstroemia* sp., *Tibouchina* sp., *Hypocalyptus* sp.,

Rhododendron sp., Linum sp., Macroptilium sp., Hibiscus sp., Hydrangea sp., Ipomoea sp., Cymbidium sp., Millettia sp., Hedysarum sp., Lespedeza sp., Antigonon sp., Pisum sp., etc.

Se espera que un número de estas plantas contengan metiltransferasas flavonoides (FMT).

5 Las antocianinas metiladas poco comunes (tales como 5-metil delphinidina, 5-metil petunidina y 5-metil malvidina) se han aislado de flores de plantas en la familia Plumbaginaceae Harborne, 1967, supra). Se han reportado flores de Plumbago por contener una antocianina poco común que se metila en la posición 5-O de malvidina. Esta molécula se describe como capensinina (5-O-metil malvidina) (Harborne, 1962, 1967, supra). El copigmento flavonol presente se describe como azaleina (quercetina 5-metil éter 3-O-rhamnosida) (Harborne, 1962, 1967, supra). El análisis adicional del Plumbago capsensis de jardín común (también conocido como Plumbago auriculata) ha revelado que la
10 antocianina metilatada es 5, 7-di-O-metil malvidina (S. Bloor, resultados no publicados). Se espera que las flores de plantas en la familia Plumbaginaceae tales como Plumbago sean una fuente adecuada para las secuencias FMT que codifican los FMT que metilarían las antocianinas en las posiciones 3', 5', 3' y 5' así como también las posiciones 5-O y 7-O.

15 El aislamiento de de los cADN FMT de las plantas enumeradas anteriormente y otras se logra mediante la detección de las colecciones de cADN respectivas con la SEQ ID NO:1 y/o 4 y/o 6 y/o 11 y/o 21 y/o 26 y/o 41, y/o 43 utilizando condiciones de hibridación de baja rigurosidad tales como aquellas descritas en el Ejemplo 9 o en la introducción de la presente especificación.

20 Alternativamente, el aislamiento de fragmentos cADN de FMT se logra utilizando la reacción de cadena de polimerasa utilizando cebadores CODEHOP como se enumera en la Tabla 24 (Ejemplo 11) o cebadores degenerados como se enumera en la Tabla 27, adelante. Un ejemplo de las combinaciones de par cebador que se pueden utilizarse muestra en la Tabla 28, adelante. Se clonan los productos de amplificación en vectores de plásmido bacteriano y los fragmentos de ADN se utilizan como sondas para detectar las colecciones de cADN respectivas para aislar los clones de cADN FMT más largos y de longitud completa. La funcionalidad y especificidad de los clones de cADN se determina utilizando los métodos descritos en los Ejemplos 7, 8, 9, 10 y 11.

25 TABLA 27

Los cebadores degenerados diseñados para las áreas de similitud de secuencia aminoácidos entre metiltransferasas que actúan sobre las antocianinas		
SED ID NO:	CEBADOR	SECUENCIA (5' TO 3')
23	OMTif1	CCG GGA GCA CGA GCA CYT NAA RGA RYT
24	OMTif3	GGC CTG CCC TTC ATC CAR AAR GCN GGN G
25	OMTir4	CGT GGT AGT TCA CGT AGT TGC TCT TRT CNG CRT C

donde R = A o G, Y = C o T, M = A o C, K = G o T, S = G o C, W = A o T, H = A o C o T, B = G o C o T, V = A o G o C, D = A o G o T, N = A o G o C o T, I = desoxinosina.

TABLA 28

Pares de cebadores que se utilizan en el aislamiento de otros fragmentos de cADN FMT de diferentes plantas				
Cebador directo	SEQ ID NO:	Cebador inverso	SEQ ID NO:	Fragmento esperado(bp)
OMTif1	21	OMTir3	17	285
OMTif1	21	OMTir4	23	399

(continuación)

Pares de cebadores que se utilizan en el aislamiento de otros fragmentos de cADN FMT de diferentes plantas				
Cebador directo	SEQ ID NO:	Cebador inverso	SEQ ID NO:	Fragmento esperado(bp)
OMTIf1	21	OMTlr5	18	609
OMTIf1	21	Ad1	27	620 + 3'UTR
OMTIt2	15	OMTlr3	17	159
OMTIf2	15	OMTlr4	23	273
OMTIf2	15	OMTlr5	18	483
OMTIf2	15	Ad1	27	492 + 3'UTR
OMTIf3	22	OMTlr4	23	162
OMTIf3	22	OMTlr5	18	372
OMTIf3	22	Ad1	27	381 + 3'UTR
OMTIf4	16	OMTlr5	18	258
OMTIf4	16	Ad1	27	267 + 3'UTR
OMTlr3	17	GI-ancla	20	375 + 5'UTR
OMTlr4	23	GI-ancla	20	489 + 5'UTR
OMTlr5	18	GI-ancla	20	699 + 5'UTR

+ 3'UTR = más la no traducida 3', + 5'UTR = más la no traducida 5'

EJEMPLO 15

Uso de FMTs

- 5 Las estimaciones del tamaño esperado de los fragmentos se basan en la secuencia Petunia FMT (E20) [SEQ ID NO:4]. Se esperaría que varíen los tamaños obtenidos utilizando cADN como plantilla de diferentes especies.

10 Con el fin de producir pigmentos de delphinidina metilados en las plantas que normalmente no producen pigmentos con base en delphinidina y no contienen una metiltransferasa flavonoide capaz de metilar antocianinas, específicamente delphinidina, las construcciones que contienen la combinación de un gen F3'5'H (tal como pero no limitado al gen Viola F3'5'H quimérico) y un gen FMT (tal como pero no limitado a aquellos aislados de Petunia, Fuchsia, Torenia, Plumbago) se introducen en una especie que normalmente no produce pigmentos con base en delphinidina. Tales plantas pueden incluir pero no se limitan a clavel, crisantemo, gerbera, orquídeas, Euphorbia, Begonia y manzana.

15 Con el fin de producir pigmentos metilados en especies o variedades de especies que producen delphinidina o cianidina pero que no tienen una metiltransferasa flavonoide capaz de metilar estas antocianinas, se introducen genes FMT en especies de plantas o variedades específicas de especies que no producen pigmentos de antocianina metilados. Tales plantas incluyen pero no se limitan a pensamiento, Nierembergia, lisianthus, variedades de vid y lirio.

20 Con el fin de reducir o bloquear la producción de pigmentos metilados autóctonos se puede emplear una variedad de estrategias que incluyen pero no se limitan a tecnologías PTGS, ARNi, anticodificante, de co-supresión. Las

estrategias incluyen la introducción de secuencias FMT en especies de plantas o variedades de especies que producen pigmentos de antocianina metilados tales como petunidina, malvidina, peonidina, capsenidina u otras antocianinas metiladas. Tales especies incluyen aquellas descritas en el Ejemplo 14, tales como Impatiens, Catharanthus, cyclamen, Torenia, Petunia, Fuchsia, Plumbago, Pelargonium y ciertas variedades de vid.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> International Flor Developments Pty Ltd

<120> Secuencias genéticas que tienen actividad metiltransferasa y usos de las mismas

<130> 42.14. 84842/01

<140> EPO9004548.5

10 <141> 2003-01-24

<150> AU PS0174/02

<151> 2002-01-25

<160> 47

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 969

<212> ADN

<213> Petunia sp.

<220>

20 <223> DifE

<400> 1

```

ctcaatttga atattactac caaggattht actgaagcaa tgacaggcaa aaccgcccac    60
cctggcattc ttcgaagtga tgccctcagg aagtacattt tggaaacctc agtttatcca    120
agagagcatg agctactcaa agaactaaca aaagcttcat tcgagaatta taaagcagcg    180
agctttatgg gtcttcctca agatgaagcc cagtttctat cgatgttctc aaagctcata    240
aatgcaaaga aaactactaga gattggagtt ttcactggtt actctctgct tgttactgct    300
cttgctttgc cagaagatgg gaaagtaata gcaattgacc cggacagaga ggcatatgag    360
gttggattac cttatattca gaaggctggt gtggaacata agatcgagtt cattcaatca    420
gaagccgtgc ccgttcttga aaaactcctc tctaacgaga aagaagcagg gacatttgat    480
ttcgtgttca ttgatgctga taaggagaat tatttgaagt accatgagat agtgctaaaa    540
ttggtgaaag ttggaggagt gataggatat gacaacacct tatggtttgg gacagtggca    600
ctttcagagg atgatccaat gccagaaggt ttaagagcat taaggggaca tgttatgaag    660
gtcaatagct ttttagctac tgaccctcgt gttgaagtag ctcaacttcc aattgggtgat    720
ggccttacc cttgcaggcg tctctcctag gtccagttaa ttggtgcaat gccaaagtaa    780
cgcgaagata tgtactagat gtatgtcagg ggttgaattt attgaattta tgttgttgag    840
aagaacaaaa gttctatatt tgtgttgttt gcaagtattt gaaacttcta ggagcctttt    900
ggttgccttg aataagaaaa tcttttacag tcttttagct taaaaaaaaa aaaaaaaaaa    960
aaaaaaaaa

```


ES 2 385 533 T3

<210> 2

<211> 251

<212> PRT

<213> Petunia sp.

5 <220>

<223> DifE

<400> 2

Asn Ser Leu Asn Leu Asn Ile Thr Thr Lys Asp Phe Thr Glu Ala Met
1 5 10 15

Thr Gly Lys Thr Ala His Pro Gly Ile Leu Arg Ser Asp Ala Leu Arg
20 25 30

Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Ser Val Tyr Pro Arg Glu His Glu Leu Leu
35 40 45

Lys Glu Leu Thr Lys Ala Ser Phe Glu Asn Tyr Lys Ala Ala Ser Phe
50 55 60

Met Gly Leu Pro Gln Asp Glu Ala Gln Phe Leu Ser Met Phe Leu Lys
65 70 75 80

Leu Ile Asn Ala Lys Lys Thr Leu Glu Ile Gly Val Phe Thr Gly Tyr
85 90 95

Ser Leu Leu Val Thr Ala Leu Ala Leu Pro Glu Asp Gly Lys Val Ile
100 105 110

Ala Ile Asp Pro Asp Arg Glu Ala Tyr Glu Val Gly Leu Pro Tyr Ile
115 120 125

Gln Lys Ala Gly Val Glu His Lys Ile Glu Phe Ile Gln Ser Glu Ala
130 135 140

Val Pro Val Leu Glu Lys Leu Leu Ser Asn Glu Lys Glu Ala Gly Thr
145 150 155 160

Phe Asp Phe Val Phe Ile Asp Ala Asp Lys Glu Asn Tyr Leu Lys Tyr
165 170 175

His Glu Ile Val Leu Lys Leu Val Lys Val Gly Gly Val Ile Gly Tyr
180 185 190

Asp Asn Thr Leu Trp Phe Gly Thr Val Ala Leu Ser Glu Asp Asp Pro
195 200 205

Met Pro Glu Gly Leu Arg Ala Leu Arg Gly His Val Met Lys Val Asn
210 215 220

ES 2 385 533 T3

Ser Phe Leu Ala Thr Asp Pro Arg Val Glu Val Ala Gln Leu Ser Ile
 225 230 235 240

Gly Asp Gly Leu Thr Leu Cys Arg Arg Leu Ser
 245 250

<210> 3

<211> 45

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 3

gagagagaga gagagagaga tctcgagttt tttttttt ttttt 45

10 <210> 4

<211> 888

<212> ADN

<213> Petunia sp.

<220>

15 <223> E20

<400> 4

```

cacttctcta ttttcttgaa aagcaccctc aatttgaata ttactaccaa ggattttact 60
gaagcaatga caggcaaac cgcccaccct ggcattcttc gaagtgatgc cctcaggaag 120
tacattttgg aaacctcagt ttatccaaga gagcatgagc tactcaaaga actaacaaaa 180
gcttcattcg agaattataa agcagcgagc tttatgggtc ttcctcaaga tgaagcccag 240
tttctatcga tgttctctaa gctcataaat gcaaagaaaa cactagagat tggagttttc 300
actggttact ctctgcttgt tactgctctt gctttgccag aagatgggaa agtaatagca 360
attgaccggg acagagagggc atatgagggtt ggattacctt atattcagaa ggctggtgtg 420
gaacataaga tcgagttcat tcaatcagaa gccgtgcccg ttcttgaaaa actcctctct 480
aacgagaaaag aagcagggac atttgatttc gtgttcattg atgctgataa ggagaattat 540
ttgaagtacc atgagatagt gctaaaattg gtgaaagtgt gaggagtgat aggatatgac 600
aacaccttat ggtttgggac agtggcactt tcagaggatg atccaatgcc agaaggttta 660
agagcattaa ggggacatgt tatgaaggtc aatagctttt tagctactga ccctcgtgtt 720
gaagtagctc aactttcaat tggatgatggc cttacccttt gcaggcgtct ctcctaggtc 780
cagttaattg gtgcaatgcc aagtcaacgc gaagatatgt actagatgta tgtcaggggt 840
tgaatttatt gaatttatgt tgttgagaag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 888
    
```

<210> 5

<211> 263

20 <212> PRT

ES 2 385 533 T3

<213> Petunia sp.

<220>

<223> E20

<400> 5

Ile Pro Leu Leu Ser His Phe Ser Ile Phe Leu Lys Ser Thr Leu Asn
 1 5 10 15

Leu Asn Ile Thr Thr Lys Asp Phe Thr Glu Ala Met Thr Gly Lys Thr
 20 25 30

Ala His Pro Gly Ile Leu Arg Ser Asp Ala Leu Arg Lys Tyr Ile Leu
 35 40 45

Glu Thr Ser Val Tyr Pro Arg Glu His Glu Leu Leu Lys Glu Leu Thr
 50 55 60

Lys Ala Ser Phe Glu Asn Tyr Lys Ala Ala Ser Phe Met Gly Leu Pro
 65 70 75 80

Gln Asp Glu Ala Gln Phe Leu Ser Met Phe Leu Lys Leu Ile Asn Ala
 85 90 95

Lys Lys Thr Leu Glu Ile Gly Val Phe Thr Gly Tyr Ser Leu Leu Val
 100 105 110

Thr Ala Leu Ala Leu Pro Glu Asp Gly Lys Val Ile Ala Ile Asp Pro
 115 120 125

Asp Arg Glu Ala Tyr Glu Val Gly Leu Pro Tyr Ile Gln Lys Ala Gly
 130 135 140

Val Glu His Lys Ile Glu Phe Ile Gln Ser Glu Ala Val Pro Val Leu
 145 150 155 160

Glu Lys Leu Leu Ser Asn Glu Lys Glu Ala Gly Thr Phe Asp Phe Val
 165 170 175

Phe Ile Asp Ala Asp Lys Glu Asn Tyr Leu Lys Tyr His Glu Ile Val
 180 185 190

Leu Lys Leu Val Lys Val Gly Gly Val Ile Gly Tyr Asp Asn Thr Leu
 195 200 205

Trp Phe Gly Thr Val Ala Leu Ser Glu Asp Asp Pro Met Pro Glu Gly
 210 215 220

Leu Arg Ala Leu Arg Gly His Val Met Lys Val Asn Ser Phe Leu Ala

5

ES 2 385 533 T3

Ile Ser Lys Asp Phe Thr Glu Ser Met Ala Gly Lys Ser Gly His Gly
1 5 10 15

Ser Ile Leu Gln Ser Glu Ala Leu Lys Lys Tyr Ile Phe Glu Thr Ser
20 25 30

Val Tyr Pro Arg Glu His Glu Gln Leu Lys Glu Leu Thr Gln Ala Ser
35 40 45

Phe Asp Lys Tyr Lys Ile Val Ser Leu Met Gly Val Pro Pro Asp Glu
50 55 60

Ala Gln Phe Leu Ser Met Leu Leu Lys Ile Met Asn Ala Lys Lys Thr
65 70 75 80

Met Glu Ile Gly Val Phe Thr Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Thr Ala Leu
85 90 95

Ala Leu Pro Glu Asp Gly Lys Ile Ile Ala Ile Asp Pro Asp Arg Glu
100 105 110

Ala Tyr Glu Val Gly Leu Pro Tyr Ile Gln Lys Ala Gly Val Glu His
115 120 125

Lys Ile Glu Phe Ile Gln Ser Glu Ala Leu Pro Val Leu Glu Lys Leu
130 135 140

Leu Ser Asn Gly Glu Glu Glu Gly Thr Phe Asp Phe Ile Phe Ile Asp
145 150 155 160

Ala Asp Lys Glu Asn Tyr Leu Lys Tyr His Glu Ile Val Leu Lys Leu
165 170 175

Val Lys Val Gly Gly Val Ile Gly Tyr Asp Asn Thr Leu Trp Phe Gly
180 185 190

Thr Val Ala Leu Ser Asp Asp Asp Pro Ile Pro Gln Gly Leu Arg Glu
195 200 205

Leu Arg Arg Ser Val Leu Lys Ile Asn Ser Phe Leu Ala Thr Asp Pro
210 215 220

Arg Ile Glu Leu Ala His Leu Ser Ile Gly Asp Gly Leu Thr Leu Gly
225 230 235 240

Arg Arg Leu Ser

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

ES 2 385 533 T3

<400> 8
 cttgcttgc cagaagatgg 20
 <210> 9
 <211> 32
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 9
 10 gcatggatcc acaggcaaaa ccgcccaccc tg 32
 <210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 10
 gcatctgcag ctaggagaga cgctgcaaa g 31
 <210> 11
 20 <211> 1006
 <212> ADN
 <213> Torenia sp.
 <220>
 <223> TMT5.
 25 <400> 11
 ttcaattccg ccattttctc caataataac attcataaat acaatcagca gcagcaaaaa 60
 tgaaagataa gttctatggc accatthtgc agagcgaagc cctcgcaaag tatctgttag 120
 agacaagtgc ctatccacga gaacatccgc agctcaaaga actaaggagc gcaactgtgg 180
 acaagtatca atattggagc ttgatgaatg ttccagctga tgaggggcag ttcatttcaa 240
 tgttactgaa aattatgaac gcaaaaaaga caattgaagt tggagtthtc acaggctact 300
 cactcctatc aactgctctg gctctacctg atgatggcaa aatcgttgcc attgatcctg 360
 atagagaagc ttatgagact ggthtgccat ttatcaagaa agcaaactg gctcataaaa 420
 tccaatacat acaatctgat gccatgaaag tcatgaaatga cctcattgct gccaaaggag 480

ES 2 385 533 T3

```
aagaagaaga ggggagcttt gactttgggt tcgtggatgc agacaaagaa aactacataa 540
actaccacga gaaactggtg aagctgggta aggttggagg gatcatagga tacgacaaca 600
ctctgtggtc tggaacagtt gctgcatctg aagacgatga gaataatatg cgagactact 660
taagagggtg cagagggcat atcctcaaac taaactcctt tctcgcaaac gatgatcgga 720
ttgaattggc tcacctctct attggagatg gactcacctt gtgcaaactg ctcaataat 780
aattttcaac tttattatta ttgtttcata aaaagcattt actgctggcc tggcctggcc 840
tgtttcagca tcttatattt ctattgttct aaatatttta gttatcttgt ttatcaactt 900
gtctgtctta tatgtttaaag agaaagatgt catgtaattg taactcgatc gggctcttgt 960
aatattataa tgaattttat tgattttcaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1006
```

<210> 12

<211> 239

<212> PRT

5 <213> Torenia sp.

<220>

<223> TMT5.

<400> 12

ES 2 385 533 T3

Met Lys Asp Lys Phe Tyr Gly Thr Ile Leu Gln Ser Glu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Lys Tyr Leu Leu Glu Thr Ser Ala Tyr Pro Arg Glu His Pro Gln Leu
20 25 30

Lys Glu Leu Arg Ser Ala Thr Val Asp Lys Tyr Gln Tyr Trp Ser Leu
35 40 45

Met Asn Val Pro Ala Asp Glu Gly Gln Phe Ile Ser Met Leu Leu Lys
50 55 60

Ile Met Asn Ala Lys Lys Thr Ile Glu Val Gly Val Phe Thr Gly Tyr
65 70 75 80

Ser Leu Leu Ser Thr Ala Leu Ala Leu Pro Asp Asp Gly Lys Ile Val
85 90 95

Ala Ile Asp Pro Asp Arg Glu Ala Tyr Glu Thr Gly Leu Pro Phe Ile
100 105 110

Lys Lys Ala Asn Val Ala His Lys Ile Gln Tyr Ile Gln Ser Asp Ala
115 120 125

Met Lys Val Met Asn Asp Leu Ile Ala Ala Lys Gly Glu Glu Glu Glu
130 135 140

Gly Ser Phe Asp Phe Gly Phe Val Asp Ala Asp Lys Glu Asn Tyr Ile
145 150 155 160

Asn Tyr His Glu Lys Leu Leu Lys Leu Val Lys Val Gly Gly Ile Ile
165 170 175

Gly Tyr Asp Asn Thr Leu Trp Ser Gly Thr Val Ala Ala Ser Glu Asp
180 185 190

Asp Glu Asn Asn Met Arg Asp Tyr Leu Arg Gly Cys Arg Gly His Ile
195 200 205

Leu Lys Leu Asn Ser Phe Leu Ala Asn Asp Asp Arg Ile Glu Leu Ala
210 215 220

His Leu Ser Ile Gly Asp Gly Leu Thr Leu Cys Lys Arg Leu Lys
225 230 235

<210> 13

<211> 37

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TMT5. BamHI. F oligonucleótido
 <400> 13
 gcatggatcc aaagataagt tctatggcac cattttg 37
 5 <210> 14
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> TMT5 . PstI . R oligonucleótido
 <400> 14
 gcatctgcag ttatttgaga cgtttgaca aggtg 35
 <210> 15
 <211> 26
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> OMTIf2 oligonucleótido
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> N = A o G o C o T
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (24)..(24)
 <223> N = A o G o C o T
 <400> 15
 accatcgaga tcggcgtnntt ycangg 26
 <210> 16
 30 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido OMTIf4
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)

<223> Y = C o T
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 5 <223> N = A o G o C o T
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> Y = C o T
 10 <400> 16
 cgacttcgcc ttcgtggayg cngayaa 27
 <210> 17
 <211> 31
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido OMTIr3
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (23)..(23)
 <223> N = A o G o C o T
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 25 <223> N = A o G o C o T
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> Y = C o T
 30 <400> 17
 tgaagttgat cttgtgctcc acnccngcyt t 31
 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido OMTIr5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> N = A o G o C o T
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> R = A o G
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> N = A o rG o C o T
 <400> 18
 cgccggcaga aggtganncc rtcnc 26
 15 <210> 19
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> oligonucleótido dT(17)Ad2Ad1
 <400> 19
 ctgagagaac tagtctcgag ctctagaaca agctttttt tttt 45
 <210> 20
 <211> 36
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> anclaje de oligonucleótido GI
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> I = desoxiinosina
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (29)..(30)
 <223> I = desoxiinosina
 <220>

ES 2 385 533 T3

<221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> I = desoxiinosina

<400> 20

5 ggccacgcgt cgactagtac gggnggggnn gggngng 36

<210> 21

<211> 780

<212> ADN

<213> Fuchsia sp.

10 <220>

<223> FMT

<400> 21

```

accatcgaga tcggcgctct cactggctat tctctcttt gcactgcact tgetttgcct    60
cccgatggca agataacagc gatcgacccc gacaaagaag cttacgagac cgggctgccca    120
tttattcaga aagctggagt gggacataag atcaacttca tcaatggtga cgcacttgca    180
gtactcgacg atcttattgc agacggaaaa gatcaagagg ggagttttga ttttgogttc    240
gtggatgcta acaaggaaga ttacatcaag taccacgaac agctgcttaa acttgtcaag    300
gtaggtggct tgatctgcta cgacaacacc ctgtgggttcg ggtcgggtgpc gctctccgaa    360
gaagatccca tggacgagtt tatgagaagc ggcaggggtcc cgcttaggaa gttgaacgac    420
ttcctcgcaa atgaccccg tatcgagtca tgccttgttt ccatcggtga tggcctcacc    480
ctctgccgcc gccgctccta atgcactctg agagagttac tggcccctag ctagctagct    540
agctcgttgt tgttatatat atattatccg attgatatgt ggattctcac catatgtacg    600
tggattctgc gtactatcca gtggcgctt ttgttgcatc tatctatatt tctagtttat    660
tatatgtacc atattcgctt ccgatatgtg cgaataagtc ggatgccatg cttccgatgg    720
ggtatcgttc ttattttcaa tcgttagtga tttttaagtt gagcaaaaaa aaaaaaaaaa    780

```

<210> 22

15 <211> 166

<212> PRT

<213> Fuchsia sp.

<220>

<223> FMT

20 <400> 22

Thr Ile Glu Ile Gly Val Phe Thr Gly Tyr Ser Leu Leu Cys Thr Ala
1 5 10 15

Leu Ala Leu Pro Pro Asp Gly Lys Ile Thr Ala Ile Asp Pro Asp Lys

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> R = A o G
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> Y = C o T
 <400> 23
 10 ccgggagcac gagcacytna argaryt 27
 <210> 24
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> oligonucleótido OMTIf3
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 20 <223> R = A o G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> R = A o G
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> N = A o G o C o T
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> N = A o G o C o T
 <400> 24
 ggcctgccct tcatccaraa rgcnngng 28
 35 <210> 25
 <211> 34
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido OMTIr4
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> R = A o G
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (32)..(32)
 <223> R = A o G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 15 <223> N = A o G o C o T
 <400> 25
 cgtgtagtgc cacgtagtgc ctcttrtcng crtc 34
 <210> 26
 <211> 1079
 20 <212> ADN
 <213> Petunia sp.
 <220>
 <223> E.33
 <400> 26

ES 2 385 533 T3

atctctcggg caagttcgat tacctttgaa tctccaagga ctttactgaa tcaatggcag 60
gcaaaagcgg acatggctcc attcttcaaa gtgaagccct caagaagtac atcttcgaaa 120
ctagtgtgta tccaagagaa cacgagcaac tcaaagaact cacacaagcc tcattcgata 180
agtataaaat agtgagcttg atgggtgtgc ctccagatga agcccaattt ctctcgatgc 240
tcttaaaaaat aatgaatgca aagaagacaa tgggagattg agtttttacc ggttattctc 300
ttctggctac tgctcttga ttgccagaag atggaaaaat tatagcgatt gatccggaca 360
gagaagcata tgaggttggg ttgccatata ttcagaaggc tgggtgtggag cataagattg 420
aatttattca atcagaagcc ttaccagtac tcgaaaaact cctctctaac ggtgaggaag 480
aaggaacatt tgatttcata ttcattgatg ctgataagga gaactatctg aagtaccatg 540
agatagtact aaaattgggt aaagtgggag gagtgatagg ctatgacaac acattatggt 600
ttgggaccgt ggcactttca gatgatgatc ctataccaca aggccttaaga gaattgagga 660
gatcggtttt gaagatcaac agtttttag ctactgatcc tcgcattgaa ttagctcatc 720
tttcaattgg tgatggctct acccttggca ggcgtctcag ctagtttatt tttcgtataa 780
tcacttgaat tccggaatcc attatcttta tagttttttg ttttccagta ctagtgatat 840
tttccagtc ccacttatgg ataactgg gtaatgagta ttgttcaga agtagtgaca 900
tttttaagtt tggttcgtcc atctgctaaa gaagtcacga tttcgtcttg tagacgagct 960
atagtatgca tttgcatttt ggtaatttc gcatgtagtg ttgaaatgtg aattaccaa 1020
agcaaaagta ataaaatggt tacatttgtt gtgttttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1079

<210> 27

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido Ad1

<400> 27

ctgagagaac tagtctcgag 20

10 <210> 28

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido petD8#1

<400> 28

ccctcgagtt tctattttgt gtgtgttg 28

<210> 29

<211> 26

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido petD8#2
 <400> 29
 ggaattcta gagctcgagg atcacg 26
 5 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> oligonucleótido PMT-F
 <400> 30
 actaccaagg atcctactga agca 24
 <210> 31
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido PMT-R
 <400> 31
 20 ctggaatgaa gcttttgta 20
 <210> 32
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> oligonucleótido TMT-F
 <400> 32
 cataaatagg atccgcagca gcaa 24
 <210> 33
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido TMT-R
 35 <400> 33
 agtctcataa gcttcttat 0
 <210> 34

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> oligonucleótido FucR1
 <400> 34
 gcaagtgcag tgcaaagaag ag 22
 <210> 35
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido FucR3
 <400> 35
 15 gatcttatgt tccactccgc 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> oligonucleótido FucR5
 <400> 36
 gagagatctg accagtaagg 20
 <210> 37
 25 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido FucR6
 30 <400> 37
 ggatattttt cggcogtgac ctcc 24
 <210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido FucF1

ES 2 385 533 T3

<400> 38
atcttagaga cgactgctta tccc 24
<210> 39
<211> 68
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> oligonucleótido Tor-5' pos
<400> 39
aattcgcagc aaaaatgaaa gataagttct atggcaccat tttgcagagc gaagccctcg 60
10 **caaagtat 68**
<210> 40
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> oligonucleótido Tor-5' neg
<400> 40
tactttgcca gggcttcgct ctgcaaaatg gtgccataga acttatcttt catttttgcct 60
gcg 63
<210> 41
20 <211> 841
<212> ADN
<213> Fuchsia sp.
<220>
<223> FMT (3282)
25 <400> 41
atcttagaga cgactgctta tcccggagaa aatgagcadc tgaagcaact cggggaggtc 60
acggccgaaa aatatacctta ctggagcatg atgaatgtgt caattgacga gggacaactt 120
atatcgctaa tattgaagct catgaacgcg agaaagacat tagagatcgg cgtcttcact 180
ggctattctc ttctttgcac tgcacttget ttgcctcccg atggcaagat aacagcgcac 240
gaccccgaca aagaagctta cgagaccggg ctgccattta ttcagaaagc tggagtggaa 300

ES 2 385 533 T3

cataagatca acttcatcaa tggtagcgcg cttgcagtac tgcagatct tattgcagac 360
 ggaaaagatc aagaggggag ttttgatgtt gcgttcgtgg atgctaaca ggaagattac 420
 atcaagtacc acgaacagct gcttaaactg gtcaaggtag gtggcttgat ctgctacgac 480
 aacacctgt ggttcgggtc ggtggcgctc tccgaagaag atcccatgga tgagtttatg 540
 aggagcggca gggtcaccaat taggaagtg aacgacttcc tgcgcaatga cccccgtatc 600
 gagtcatgcc ttgtttccat cggtagatggc atcacctct gccgccgccc cctctaatac 660
 atctcgagag agttactggc ccttagctag ctagctcgtt gttgttatat atatatatta 720
 tccgattgat atgtggattc tcaccatag tacgtggatt ctgtgtacta tccagtggcg 780
 cctttgttg catctatcta tatttctagt ttattttatg taaccaaaaa aaaaaaaaaa 840
 a 841

<210> 42

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Fuchsia sp.

<220>

<223> FMT (3282)

<400> 42

Ile Leu Glu Thr Thr Ala Tyr Pro Gly Glu Asn Glu His Leu Lys Gln
 1 5 10 15
 Leu Arg Glu Val Thr Ala Glu Lys Tyr Pro Tyr Trp Ser Met Met Asn
 20 25 30
 Val Ser Ile Asp Glu Gly Gln Leu Ile Ser Leu Ile Leu Lys Leu Met
 35 40 45
 Asn Ala Arg Lys Thr Leu Glu Ile Gly Val Phe Thr Gly Tyr Ser Leu
 50 55 60
 Leu Cys Thr Ala Leu Ala Leu Pro Pro Asp Gly Lys Ile Thr Ala Ile
 65 70 75 80
 Asp Pro Asp Lys Glu Ala Tyr Glu Thr Gly Leu Pro Phe Ile Gln Lys
 85 90 95
 Ala Gly Val Glu His Lys Ile Asn Phe Ile Asn Gly Asp Ala Leu Ala
 100 105 110
 Val Leu Asp Asp Leu Ile Ala Asp Gly Lys Asp Gln Glu Gly Ser Phe
 115 120 125
 Asp Phe Ala Phe Val Asp Ala Asn Lys Glu Asp Tyr Ile Lys Tyr His

ES 2 385 533 T3

130 135 140
 Glu Gln Leu Leu Lys Leu Val Lys Val Gly Gly Leu Ile Cys Tyr Asp
 145 150 155 160
 Asn Thr Leu Trp Phe Gly Ser Val Ala Leu Ser Glu Glu Asp Pro Met
 165 170 175
 Asp Glu Phe Met Arg Ser Gly Arg Val Pro Ile Arg Lys Leu Asn Asp
 180 185 190
 Phe Leu Ala Asn Asp Pro Arg Ile Glu Ser Cys Leu Val Ser Ile Gly
 195 200 205
 Asp Gly Ile Thr Leu Cys Arg Arg Arg Leu
 210 215

<210> 43

<211> 943

<212> ADN

5 <213> Fuchsia sp.

<220>

<223> FMT completo (3289)

<400> 43

```
aattcgcagc aaaaatgaaa gataagttct atggcaccat tttgcagagc gaagccctcg 60
caaagtatat cttagagacg accgcttctc cccgagaaaa tgagcatctg aagcaactcc 120
gggaggtcac ggccgaaaaa tctccttact ggagcatgat gaatgtgtca attgacgagg 180
gacaacttat atcgctaata ttgaagctca tgaacgcgag aaagacatta gagatcggcg 240
tcttactcgg ctattctctt ctttgcactg cacttgcttt gcctcccgat ggcaagataa 300
cagcgatcga ccccgacaaa gaagccttac agaccgggct gccatttatt cagaaagctg 360
gagtgaaca taagatcaac ttcacaaatg gtgacgcact tgcagtactc gacgatctta 420
ttgcagacgg aaaagatcaa gaggggagtt ttgattttgc gttcgtggat gctaacaagg 480
aagattacat caagtaccac gaacagctgc ttaaactggt caaggtaggt ggcttgatct 540
gctacgacaa caccctgtgg ttcgggtcgg tggcgctctc cgaagaagat cccatggatg 600
agtttatgag gagcggcagg gtccaatta ggaagttgaa cgacttctc gcaaatgacc 660
cccgtatcga gtcatgcctt gtttccatcg gtgatggcat caccctctgc cgccgccc 720
tctaattgat ctgagagag ttactggccc ctacttagct agctcgttgt tgttatata 780
atatattatc cgattgatat gtggattctc accatagta cgtggattct gtgtactatc 840
cagtggcggc tttgttgca tctatctata tttctagttt attttatgta ccaaaaaaaa 900
aaaaaaaaag cttgttctac agctcgagac tagttctctc aaa 943
```

10 <210> 44

<211> 236

<212> PRT

<213> Fuchsia sp.

<220>

15 <223> FMT completo (3289)

ES 2 385 533 T3

<400> 44

Met Lys Asp Lys Phe Tyr Gly Thr Ile Leu Gln Ser Glu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Thr Ala Tyr Pro Gly Glu Asn Glu His Leu
 20 25 30

Lys Gln Leu Arg Glu Val Thr Ala Glu Lys Tyr Pro Tyr Trp Ser Met
 35 40 45

Met Asn Val Ser Ile Asp Glu Gly Gln Leu Ile Ser Leu Ile Leu Lys
 50 55 60

Leu Met Asn Ala Arg Lys Thr Leu Glu Ile Gly Val Phe Thr Gly Tyr
 65 70 75 80

Ser Leu Leu Cys Thr Ala Leu Ala Leu Pro Pro Asp Gly Lys Ile Thr
 85 90 95

Ala Ile Asp Pro Asp Lys Glu Ala Tyr Glu Thr Gly Leu Pro Phe Ile
 100 105 110

Gln Lys Ala Gly Val Glu His Lys Ile Asn Phe Ile Asn Gly Asp Ala
 115 120 125

Leu Ala Val Leu Asp Asp Leu Ile Ala Asp Gly Lys Asp Gln Glu Gly
 130 135 140

Ser Phe Asp Phe Ala Phe Val Asp Ala Asn Lys Glu Asp Tyr Ile Lys
 145 150 155 160

Tyr His Glu Gln Leu Leu Lys Leu Val Lys Val Gly Gly Leu Ile Cys
 165 170 175

Tyr Asp Asn Thr Leu Trp Phe Gly Ser Val Ala Leu Ser Glu Glu Asp
 180 185 190

Pro Met Asp Glu Phe Met Arg Ser Gly Arg Val Pro Ile Arg Lys Leu
 195 200 205

Asn Asp Phe Leu Ala Asn Asp Pro Arg Ile Glu Ser Cys Leu Val Ser

210

215

220

Ile Gly Asp Gly Ile Thr Leu Cys Arg Arg Arg Leu
 225 230 235

<210> 45

5 <211> 8

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido
<400> 45
gggatccc 8
5 <210> 46
<211> 8
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> oligonucleótido
<400> 46
ggcgcgcc 8
<210> 47
<211> 8
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> oligonucleótido
<400> 47
20 ggtcgacc 8

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25: 3389, 1997
- Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990
- Andersen et al., Pytochemistry, 38: 1513-1517, 1995
- 5 Andersen, Biochemical systematics and ecology, 20: 145-148, 1992
- Ando et al., Biochemical systematics and ecology, 27: 623-650, 1999
- Australian Provisional Patent Applications No. 2002951088 and 2002952835 entitled "Genetic Sequences and uses therefor", 2002
- Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15, 1998
- 10 Aviv and Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408, 1972
- Ballington et al., Can. J of Plant Sci., 68: 241-246, 1988
- Bonner and Laskey, Eur. J. Biochem. 46: 83, 1974
- Brouillard and Dangles, In: The Flavonoids - Advances in Research since 1986. Harborne, J.B. (ed), Chapman and Hall, London, UK, 1-22, 1993
- 15 Brugliera et al., Plant J. 5, 81-92, 1994
- Bullock et al., Biotechniques 5: 376, 1987
- Cachio et al., American J of Ecology and Viticulture, 43: 244-248, 1992
- Carew and Krueger, Phytochemistry, 15: 442, 1976
- Catalano et al., J. Agricultural and Food Chemistry, 49: 4568-4570, 1998
- 20 Chriki and Harborne, Phytochemistry, 22: 2322-2323, 1983
- Chriki, Agronomie, 10: 553-540, 1990
- Christensen et al., Plant Mol. Biol. 36: 219-227, 1998
- Comai et al., Plant Mol. Biol. 15: 373-381, 1990
- Comai et al., Plant Molecular Biology 15: 373-381, 1990
- 25 Crowdcn, Phytochemistry, 21: 2989-2990, 1982
- Depicker, A. et al., J Mol. and Appl. Genetics, 1: 561-573, 1982
- Francis et al., JAm Soc Hortic Sci, 107: 789-791, 1982
- Franck et al., Cell 21: 285-294, 1980
- Fukui et al., Phytochemistry, 47: 1409-1416, 1998
- 30 Gamborg et al., Exp. Cell Res. 50: 151-158, 1968
- Gauthier et al., Plant Mol. Biol. 32: 1163-1169, 1996
- Goto, Tetrahedron 27: 2413-2416, 1987
- Griesbach et al., Phytochemistry 30: 1729-1731, 1991
- Griesbach, Phytochemistry, 48: 829-830, 1998
- 35 Guilley et al., Cell, 30: 763-773. 1982
- Hanahan, J. Mol. Biol. 166: 557, 1983 and. Bethesda Res. Lab. Focus. 8(2): 9, 1986
- Haslam, Practical Phenolics. From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, UK, 1998
- He and Dixon, Plant Mol. Biol. 36: 43-54, 1998
- 40 Holton and Cornish, Plant Cell 7: 1071-1083, 1995;
- Holton et al., Nature, 366: 276-279, 1993
- Hopp and Seitz, Planta 170: 74-85, 1987
- Hungria et al., Plant Physiology, 97: 751-758, 1991

- Ibrahim and Muzac, In Recent advances of phytochemistry. Evolution of metabolic pathways. Elsevier Science Ltd. 34: 349- 385, 2000
- Imrie and Hutton, J. Hered., 69: 54-56 1978
- Inoue et al., Gene 96: 23-28, 1990
- 5 Inoue et al., 1990
- Ishikura and Shibata, Bot Mag (Tokyo), 86: 1-4, 1973
- Jefferson et al., EMBO J. 6(13): 3901-3907, 1987
- Jefferson, et al., EMBO J. 6: 3901-3907, 1987
- Jonsson et al., Phytochemistry 21(10): 2457-2460, 1982
- 10 Jonsson et al., Planta 160: 174-179, 1984a
- Jonsson et al., Theor. Appl. Genet. 66: 349-355, 1983
- Jonsson et al., Theor. Appl. Genet. 68: 459-466, 1984b
- Joshi and Chiang, Plant Mol. Biol. 37: 663-674, 1998
- Kim and Fujieda, J. Kor. Soc. Hortic. Sci., 32: 247-255, 1991
- 15 Kim et al., Phytochemistry, 28: 1503-1506, 1989
- Klee et al., BiolTechnology 3: 637-642, 1985
- Kobayashi et al., Breeding Science, 48: 169-176, 1998
- Kroon et al., Plant J 5: 69-80, 1994
- Lazo et al., Bio/technology 9: 963-967, 1991
- 20 Lee et al., EMBO J. 7: 1241-1248, 1988
- Lewis et al., J. of the Science of Food and Agriculture, 77: 45-57, 1998 Marchant et al., Molecular Breeding 4: 187-194, 1998
- Markham, Techniques of flavonoid identification., Academic Press, London, 1982
- Marmur and Doty, J. Mol. Biol. 5:109, 1962
- 25 Maxwell, Plant J. 4(6): 971-981, 1993
- Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1964
- Mikanagi et al., Biochem. System and Ecol. 23: 183-200, 1995
- Mikanagi et al., Biochem. System and Ecol. 28: 887-902, 2000
- Mitchell et al., Phytochemistry, 47: 355-361, 1998
- 30 Mitsuhashi et al., Plant Cell Physiol. 37: 49-59, 1996
- Mol et al., Trends Plant Sci. 3: 212-217, 1998
- Murashige and Skoog, Physiol. Plant 15: 73-97, 1962
- Nozzolillo et al., Canadian Journal of Botany, 67: 1600-1604, 1989
- Parvez and Ogbeide, Phytochemistry, 29: 2043-2044, 1990
- 35 Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448, 1988
- Rammesmeier et al., Arch. Biochem. Biophys. 322(1): 183-188, 1995
- Rat'kin et al., Zh Obshch Biol, 41: 685-699, 1980
- Robinson and Firoozabady, Scientia Horticulturae, 55: 83-99, 1993
- Rose et al., Nucl Acids Res, 26: 1628-1635, 1998
- 40 Rout et al., Scientia Horticulturae, 81: 201-238, 1999
- Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989
- Schenk and Hildebrandt, Can. J. Bot. 50: 199-204, 1972

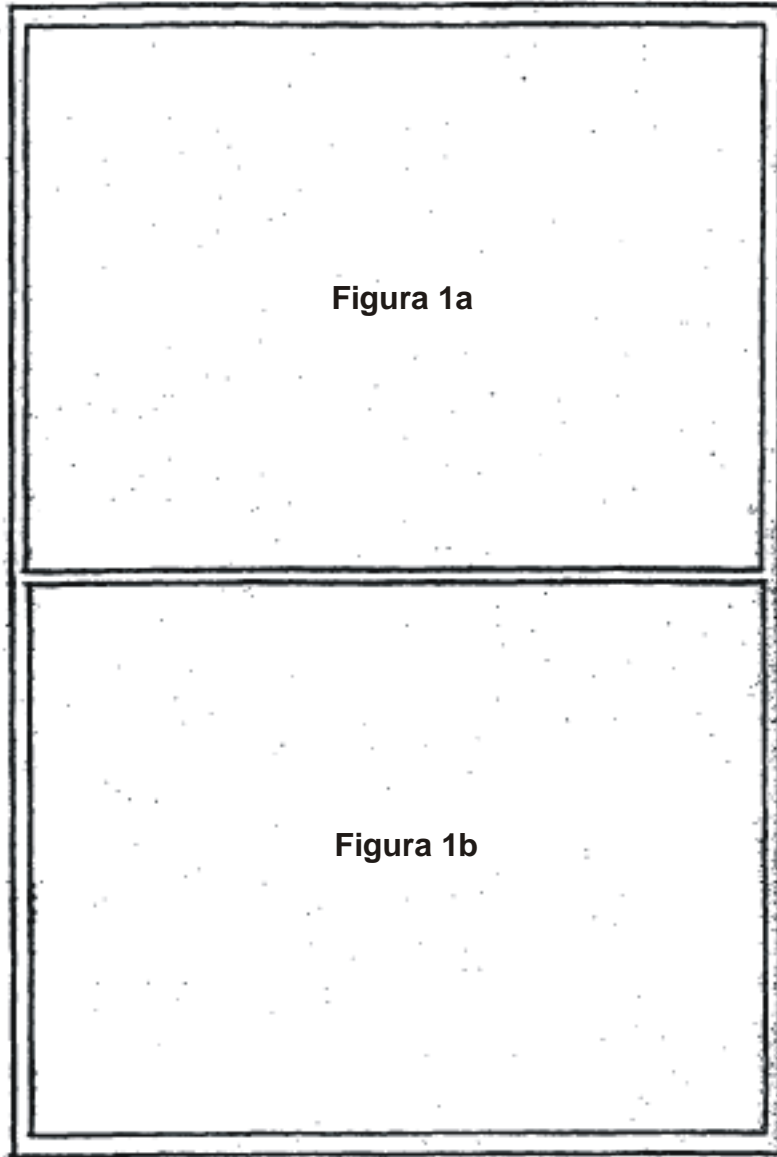
- Schroder et al., *Phytochemistry*, 59: 1-8, 2002
- Seitz and Hinderer, Anthocyanins. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Constabel, F. and Vasil, I.K. (eds.), Academic Press, New York, USA, 5: 49-76, 1988
- Sink (ed), *Petunia*, Springer-Verlag, Berlin, 1984
- 5 Skrede et al., *J of Food Science*, 65: 357-364, 2000
- Srivastava and Pande, *Planta Med*, 32: 138-140, 1977
- Stafford, *Flavonoid Metabolism*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA, 1990
- Strack and Wray, In: *The Flavonoids -Advances in Research since 1986*. Harborne, J.B. (ed), Chapman and Hall, London, UK, 1-22, 1993
- 10 Takeda et al., *Phytochemistry*, 28: 499-500, 1989
- Takeda et al., *Phytochemistry*, 29: 1089-1091, 1990
- Takeoka et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3395-3400, 1997
- Tanaka et al., *Plant Cell Physiol* 37: 711-716, 1996
- Terahara et al., *J. Natural Products*, 56: 335-340, 1993
- 15 Thompson et al., *Nucl. Acids Res.* 2: 4673-4680, 1994
- Tiwari and Minocha, *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*, 23: 305-308, 1980
- Toki and Katsuyama, *J. Jap Soc Hortic. Sci.*, 63: 853-861, 1995
- Toki et al., *Phytochemistry*, 37: 885-887, 1994
- Turpen and Griffith, *BioTechniques* 4: 11-15, 1986
- 20 Van Wyk et al., *Biochemical systematics and ecology*, 23: 295-297, 1995
- VanEngelen et al., *Transgenic Res.*4: 288-290, 1995
- Webby and Boase, *Phytochemistry*, 52: 939-941, 1999
- Winkel-Shirley, *Plant Physiol.* 126: 485-493, 2001a
- Winkel-Shirley, *Plant Physiol.* 127: 1399-1404, 2001b
- 25 Woltering and Somhorst, *J. Plant Physiol.*, 136: 295-299, 1990
- Yabuya and Noda, *Euphytica*, 103: 325-328, 1998
- Yabuya et al., *Euphytica*, 98: 163-167, 1997

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos codificante o complementaria a una secuencia que codifica una metiltransferasa flavonoide (FMT) en donde dicha secuencia de nucleótidos comprende:
- 5 (i) una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 26;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 70 % de identidad después de alineación óptima con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 26;
- (iii) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de alta rigurosidad para la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 26 o su forma complementaria;
- 10 (iv) una secuencia de nucleótidos capaz de codificar la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7;
- (v) una secuencia de nucleótidos capaz de codificar una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 70 % de identidad después de alineación óptima con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7;
- 15 (vi) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de alta rigurosidad para la secuencia de nucleótidos en (iv) o (v) o su forma complementaria.
2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 en donde el FMT modula o de otra forma facilita la metilación de una antocianina.
3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 2 en donde la molécula antocianina es un derivado de delfinidina o un derivado de petunidina o cianidina.
- 20 4. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el FMT es una S-adenosil-L-metionina O-metiltransferasa Clase I (SAM-OMT).
5. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 4 en donde el FMT es un 3' FMT o 3'5' FMT.
6. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 2 o 3 en donde la molécula antocianina es 3-glucósido delfinidina, 3,5-glucósido delfinidina o 3-rutinosida delfinidina o en donde la metilación de una molécula antocianina resulta en la producción de un derivado petunidina, malvidina o peonidina.
- 25 7. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde la molécula es de origen Petunia.
8. Una construcción genética que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 9. Una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma que comprende una molécula de ácido nucleico no autóctona como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde dicha planta o parte de la misma o células de la misma es de una especie de flor de corte, una especie hortícola o una especie agrícola, en donde la planta hortícola o agrícola exhibe preferiblemente flores alteradas o inflorescencia, en donde dicha parte modificada es preferiblemente un sépalo, bráctea, peciolo, pedúnculo, ovario, tallo, antera,
- 35 hoja, raíz, flor, semilla, fruto, nuez, baya o vegetal y/o en donde la planta se selecciona preferiblemente de una rosa, clavel, lisianthus, petunia, lirio, pensamiento, gerbera, crisantemo, Torenia, Begonia, Violeta de persia, Nierembergia, Catharanthus, Geranio pensamiento, Orquídea, uva, Euphorbia o Fuchsia.
10. Progenie, descendencia de progenie o estirpes vegetativamente propagadas de una planta genéticamente modificada que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha progenie, descendencia de progenie o estirpes vegetativamente propagadas comprenden una molécula de ácido nucleico no autóctona como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 40 11. Un método para producir una planta genéticamente modificada capaz de sintetizar FMT o con actividad FMT existente o autóctona reducida, dicho método comprende
- (a) para el propósito de producir una planta capaz de sintetizar FMT, transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico bajo condiciones que permiten la expresión eventual de dicha secuencia de ácidos nucleicos, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un periodo y bajo condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos,
- 45 (b) para el propósito de producir una planta con actividad FMT existente o autóctona reducida, transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico, regenerar una planta transgénica a
- 50

partir de la célula y cuando sea necesario cultivar dicha planta transgénica bajo condiciones suficientes para permitir la expresión del ácido nucleico o

- 5 (c) para el propósito de producir una planta con actividad FMT existente o autóctona reducida, alterar un FMT que codifica el gen a través de la modificación de las secuencias autóctonas por medio de recombinación homóloga de un ácido nucleico apropiadamente alterado introducido en la célula de planta, y regenerar la planta genéticamente modificada a partir de la célula; en donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y en donde la planta exhibe preferiblemente inflorescencia alterada.
- 10 12. Un método para producir una planta genéticamente modificada con niveles alterados de FMT codificado en una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, dicho método comprende introducir en una célula o células de dicha planta una secuencia genética seleccionada de:
- (i) una secuencia anticodificante para mRNA FMT;
- (ii) una secuencia codificante para ADN FMT; y/o
- 15 (iii) una secuencia que induce ARNi específica para mRNA FMT; y regenerar una planta genéticamente modificada de dicha célula, en donde la planta exhibe preferiblemente inflorescencia alterada.
- 20 13. Un método para producir una planta transgénica capaz de expresar un gen recombinante que codifica un FMT o parte de la misma o que lleva una secuencia de ácidos nucleicos que es sustancialmente complementaria a toda o una parte de una molécula de mRNA opcionalmente transcribible cuando se requiere para efectuar la regulación de un FMT, dicho método comprende transformar en forma estable una célula de una planta adecuada con la molécula de ácido nucleico aislada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, cuando sea necesario bajo condiciones que permiten la expresión eventual de dicha molécula de ácido nucleico aislada, y regenerar una planta transgénica a partir de la célula, en donde la planta exhibe preferiblemente inflorescencia alterada.
- 25 14. Una oligosecuencia de nucleótidos aislada establecida en la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31.
15. Un FMT recombinante aislado codificado por una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
16. El FMT recombinante aislado de la reivindicación 15 en donde el FMT recombinante es una molécula de fusión que comprende dos o más secuencias de aminoácido heterólogas.
- 30 17. Una molécula de ácido nucleico de FMT recombinante aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende una fusión de dos o más secuencias de nucleótidos heterólogas.
18. Un organismo procariótico o eucariótico que lleva una secuencia genética que codifica una molécula FMT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 extracromosómicamente en forma de plásmido.
- 35 19. Uso de una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de una planta genéticamente modificada en donde la planta genéticamente modificada exhibe flores alteradas o inflorescencia.



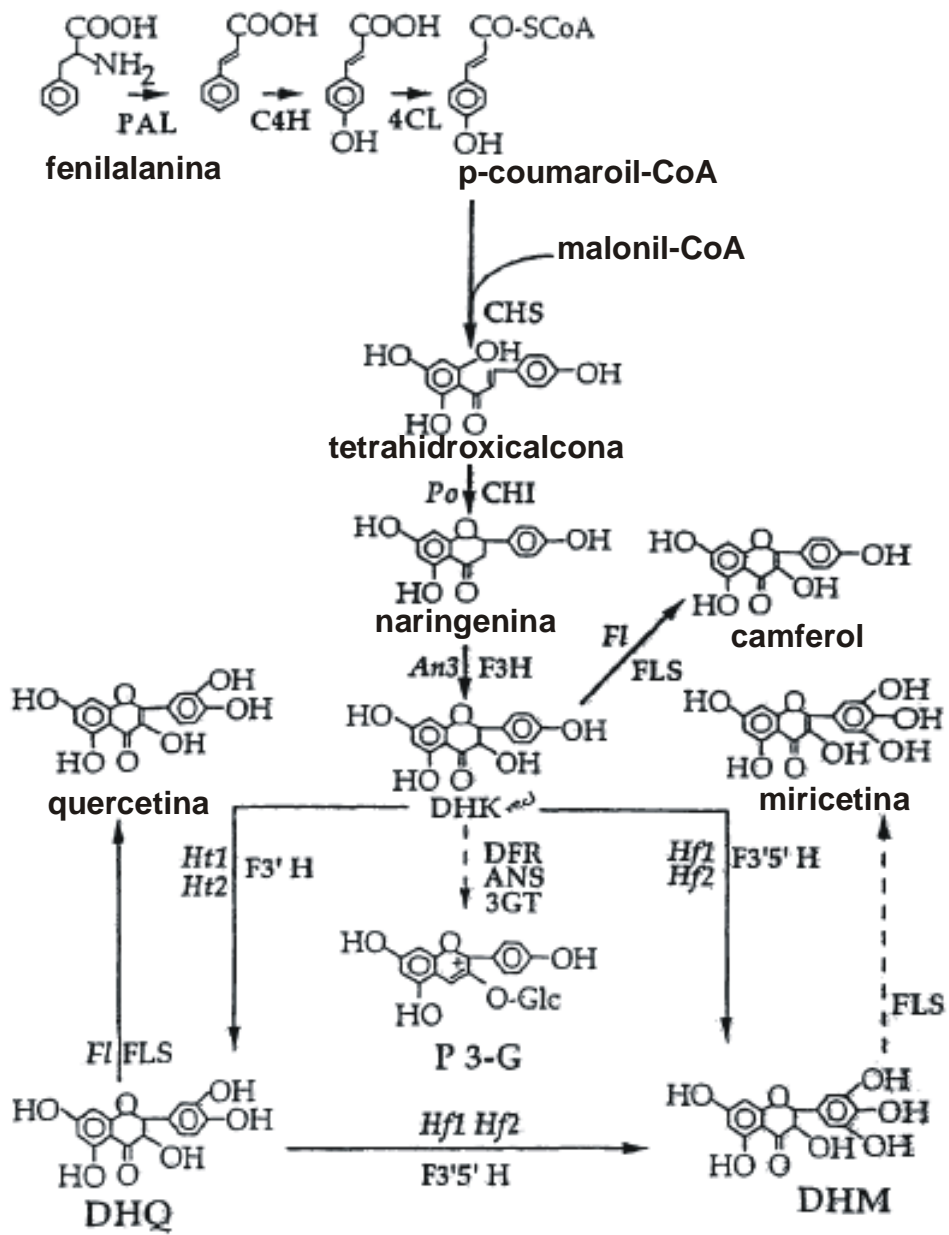


Figura 1A

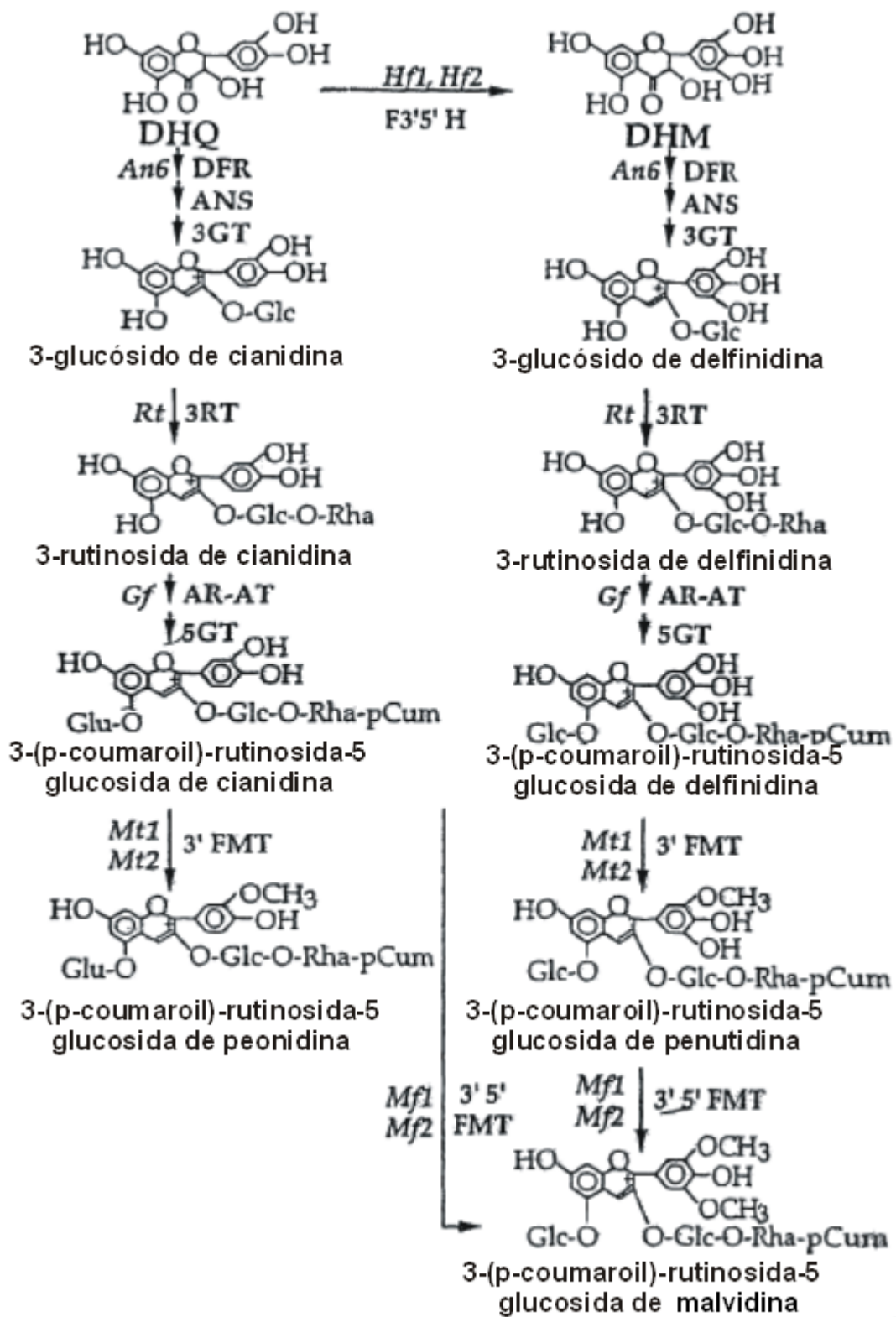
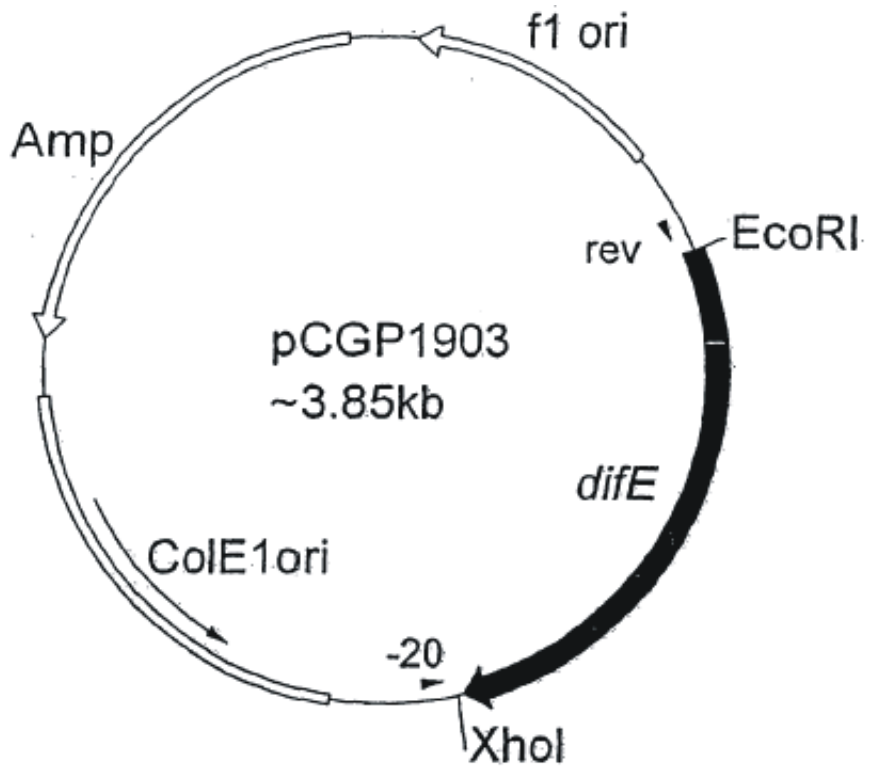


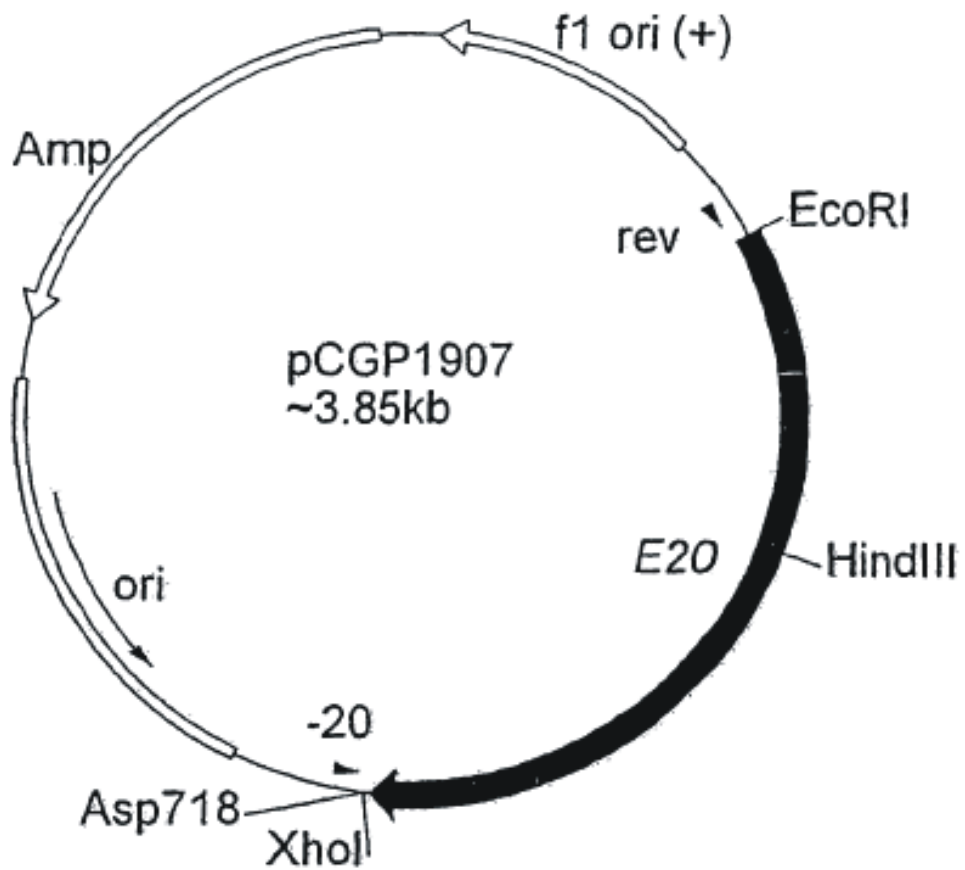
Figura 1B



Replicón: pBluescript SKII 2.95kb

Inserto: difE cADN ~0.9 kb de
P. hybrida cv. V26

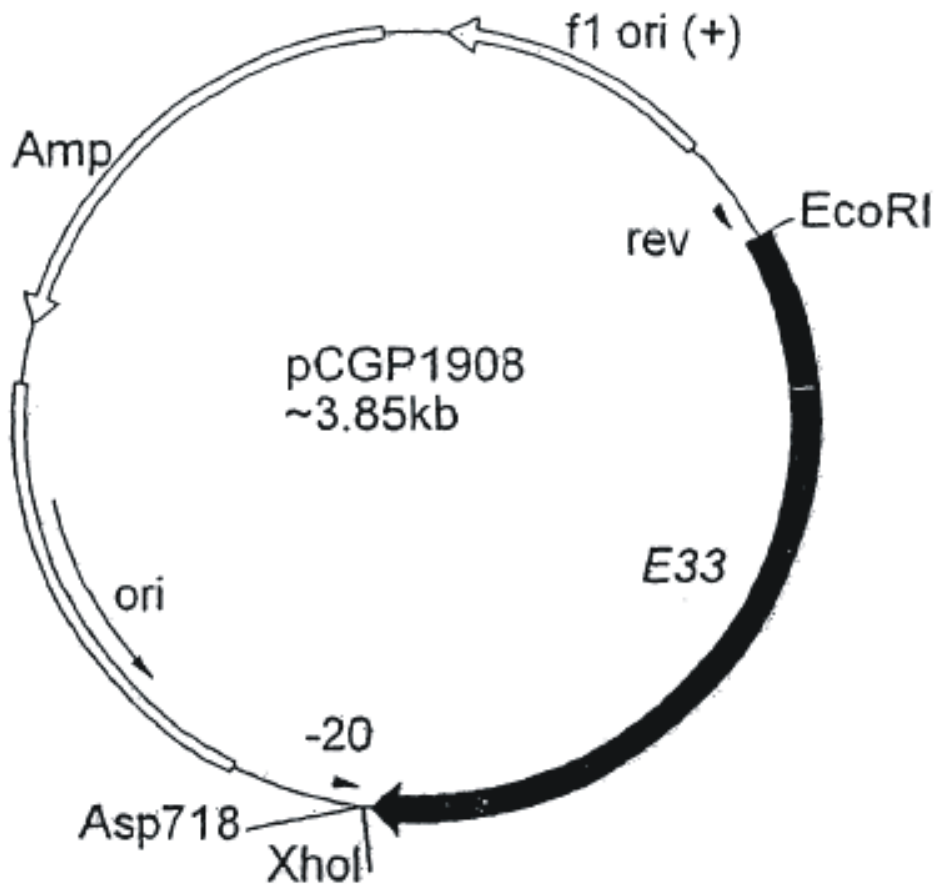
Figura 2



Replicón: pBluescript SKII (+)vector 2.95kb

Inserto: E20 cADN ~0.9 kb de
P. hybrida cv. OGB

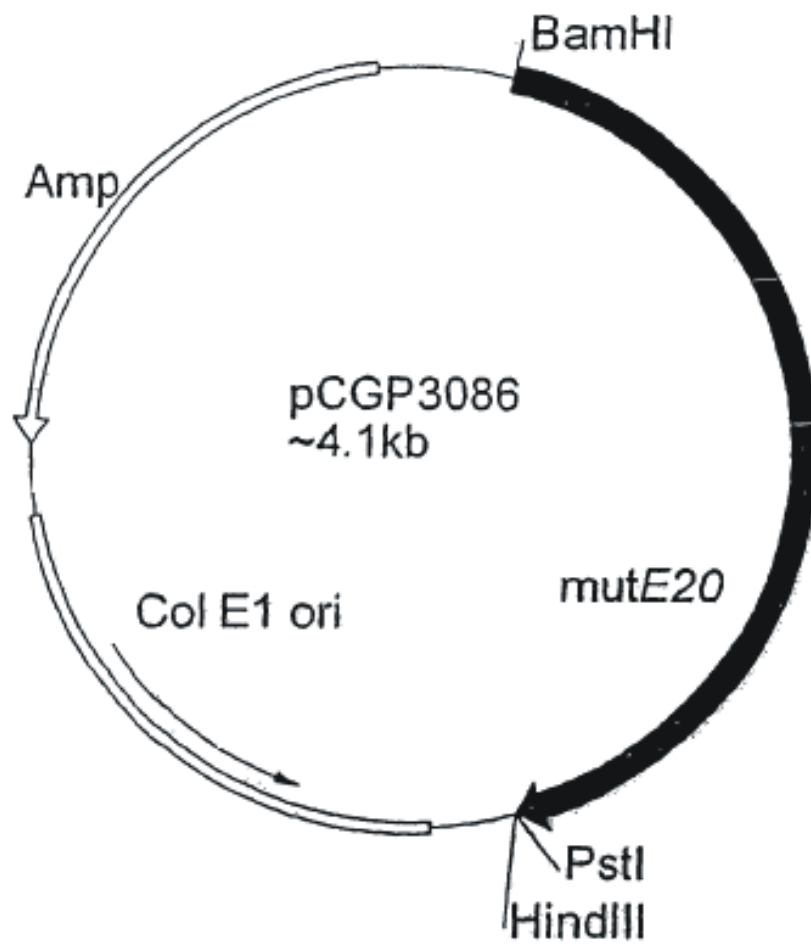
Figura 3



Replicón: pBluescript SKII (+)vector 2.95kb

Inserto: E33 cADN ~0.9 kb de
P. hybrida cv. OGB

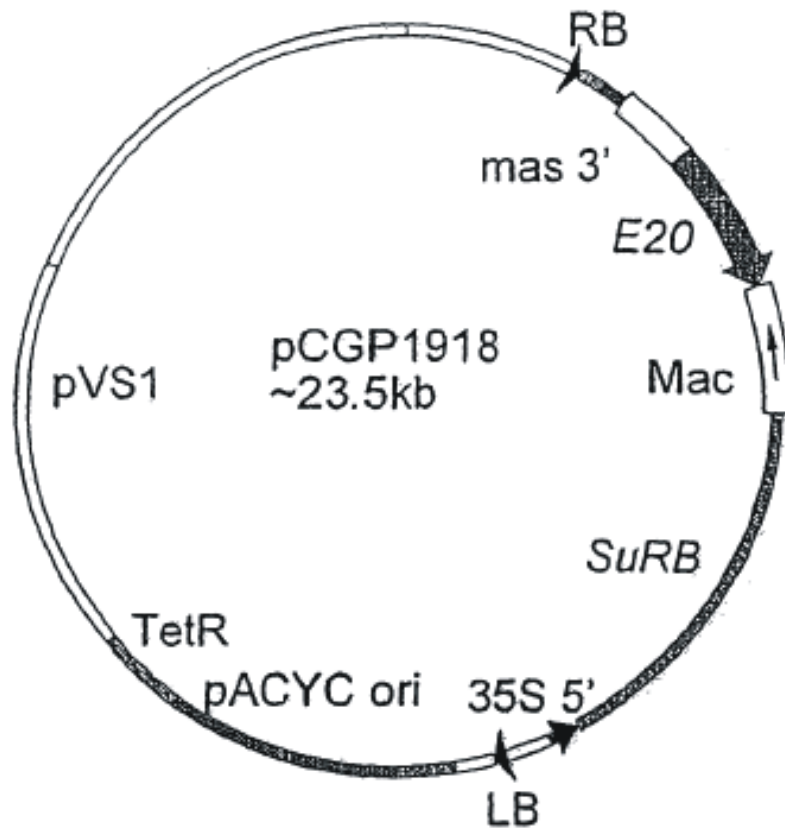
Figura 4



Replicón: pQE30 3.4kb

Inserto: mutE20 cADN ~0.7 kb de
P. hybrida cv. OGB

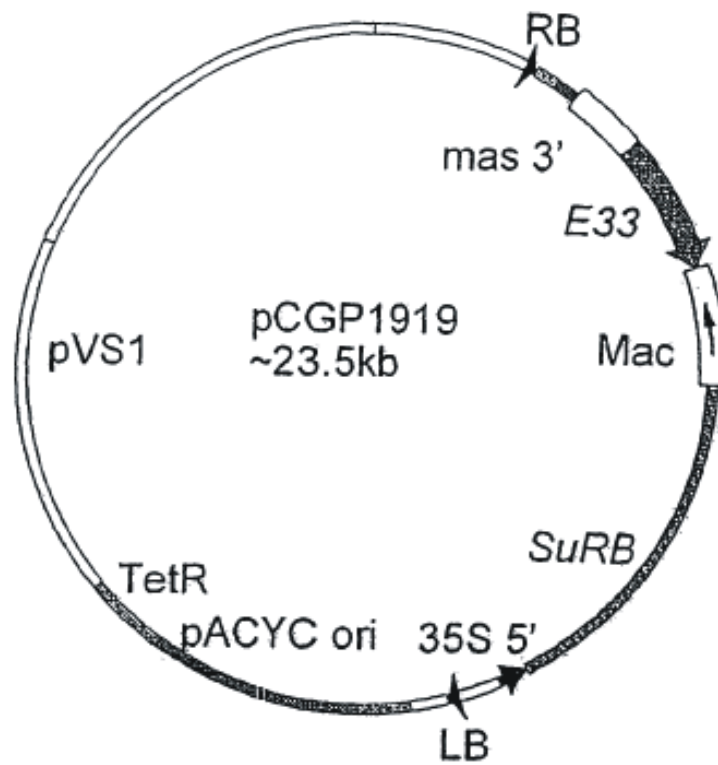
Figura 5



Replicón: pWTT2132 *Sma*I ~20.7kb

Inserto: fragmento *Bgl* II (romo) ~2.8kb de pCGP1910

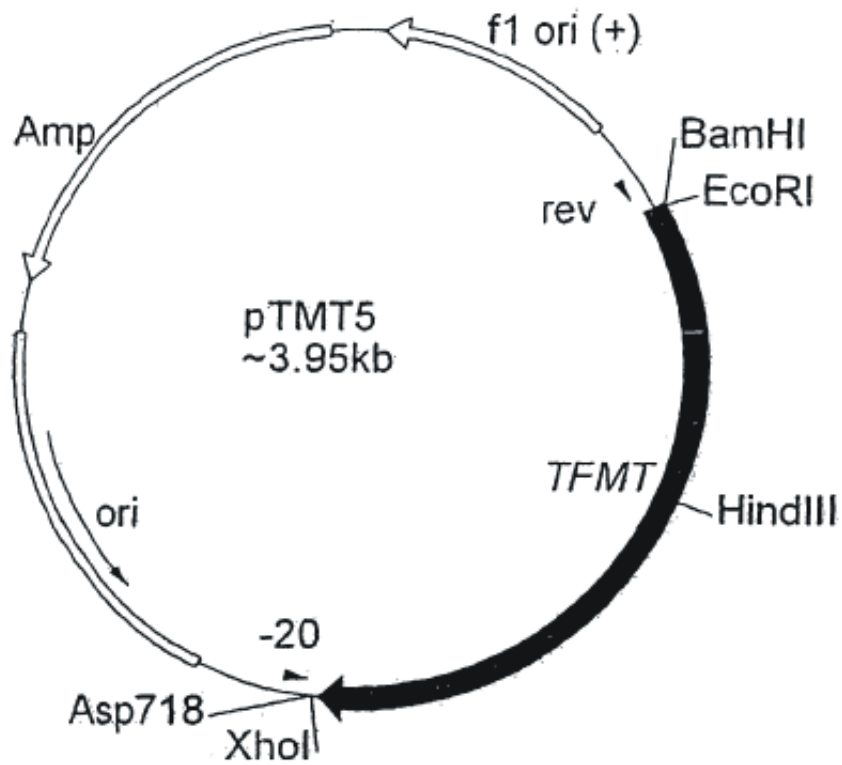
Figura 6



Replicón: pWTT2132 *Sma*I ~20.7kb

Inserto: fragmento *Bgl* II (romo) ~2.8kb de pCGP1911

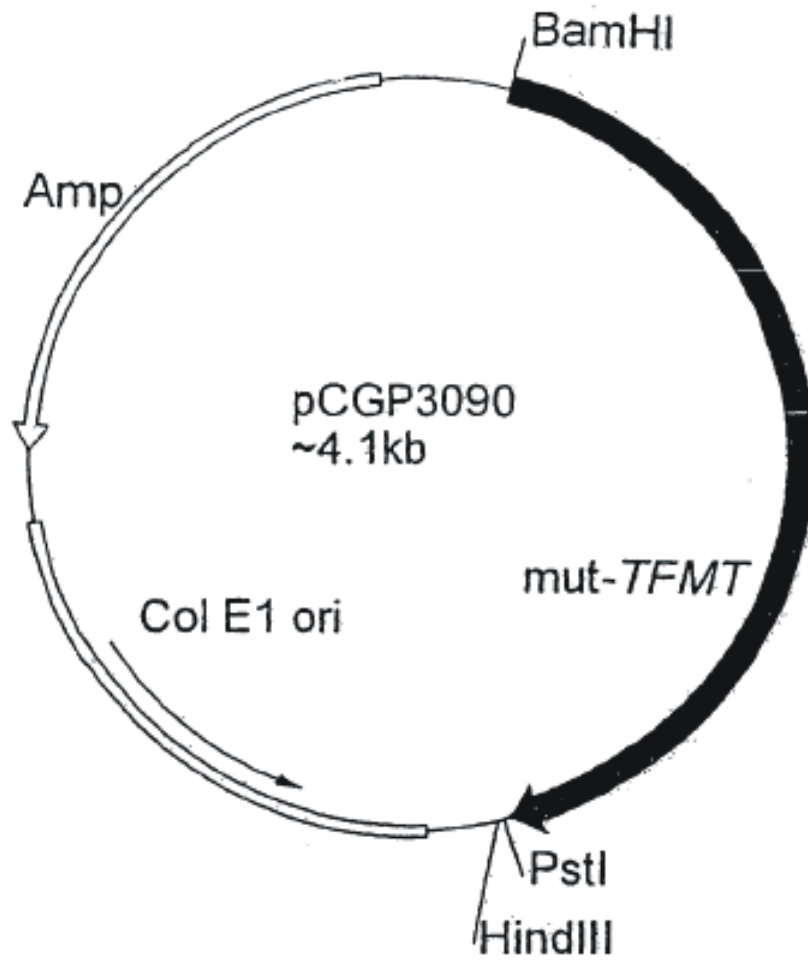
Figura 7



Replicón: pBluescript SK II (+)vector ~2.95kb

Inserto: cADN TFMT ~1kb de
Torenia Hybrida cv. Summerwave

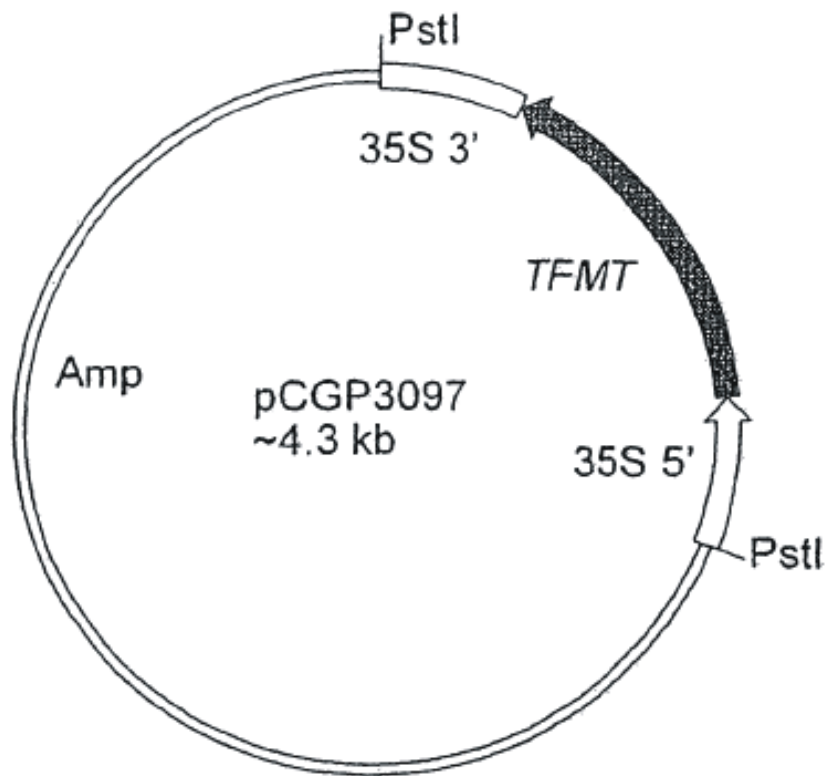
Figura 8



Replicón: pQE30 3.4kb

Inserto: mut-TFMT cADN ~0.7kb de
Torenia Hybrida cv. Summerwave

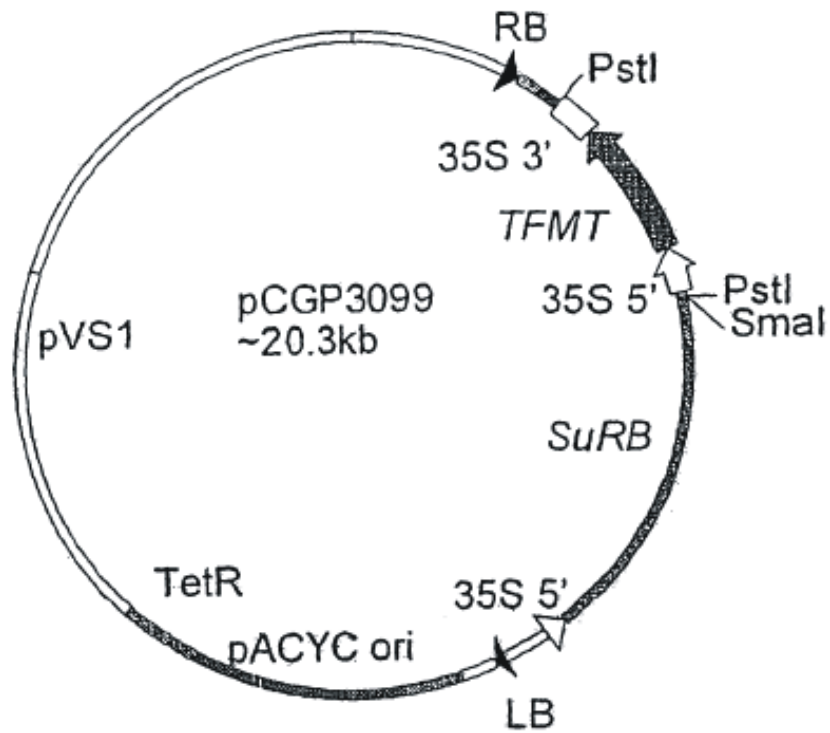
Figura 9



Replicón: ppRTppoptc XbaI (romó)/EcoRI
3.3kb

Inserto: fragmento Asp718 (romó)/EcoRI ~1.0kb
de pTMT5

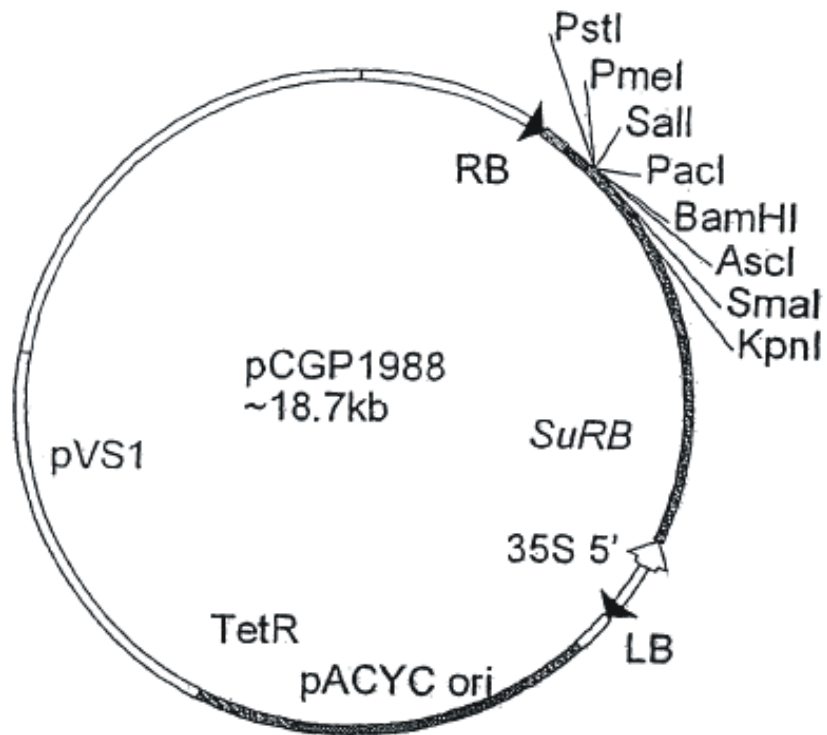
Figura 10



Replicón: pCGP1988 PstI ~18.6kb

Inserto: fragmento PstI ~1.7kb de
pCGP3097

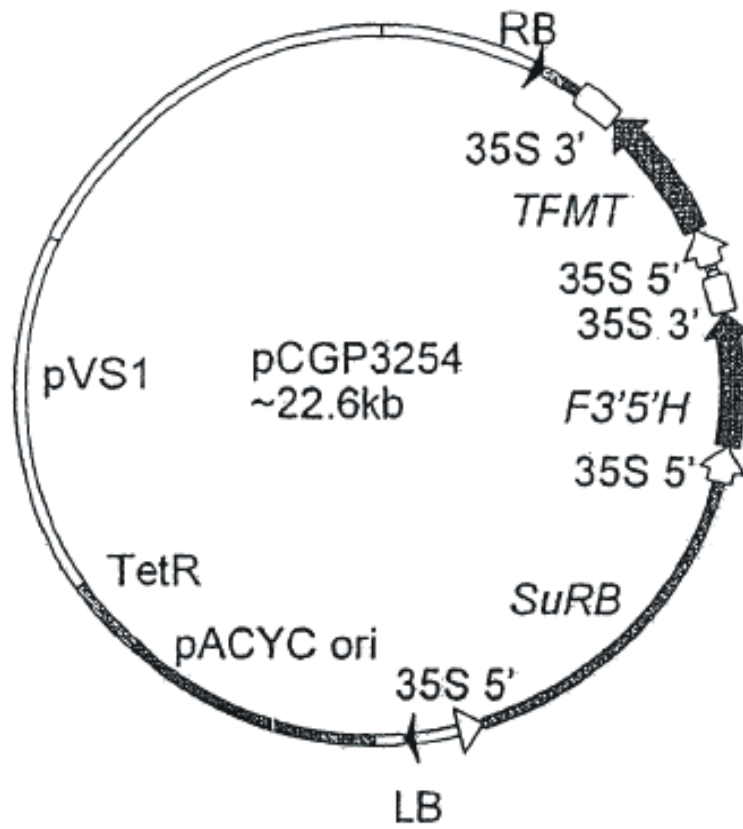
Figura 11



Replicón: pWTT2132 ~18.7kb

Inserto: Región de múltiple clonación de pNEB193

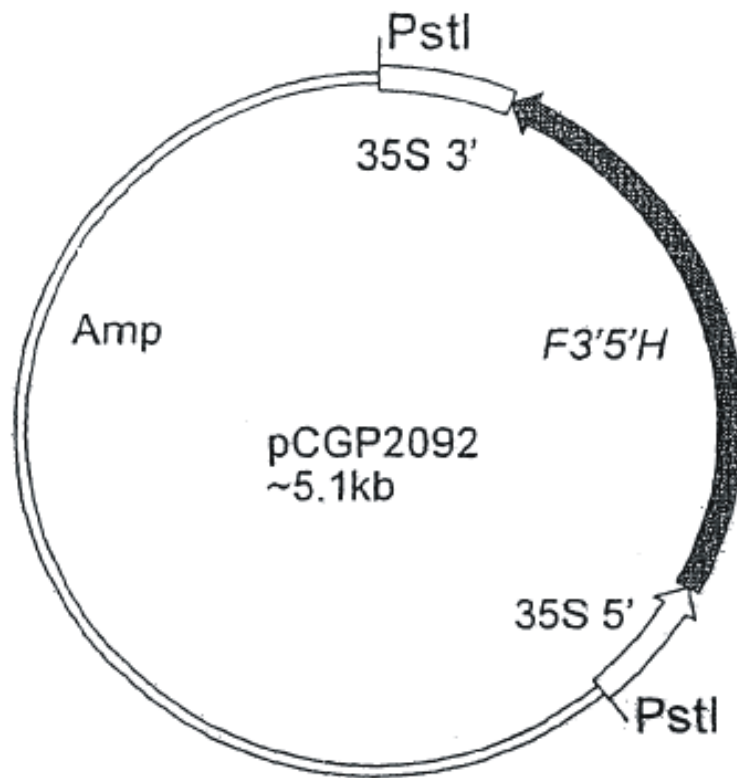
Figura 12



Replicón: pCGP3099 SmaI ~20.2kb

Inserto: fragmento PstI(romo) ~2.4kb de pCGP2092

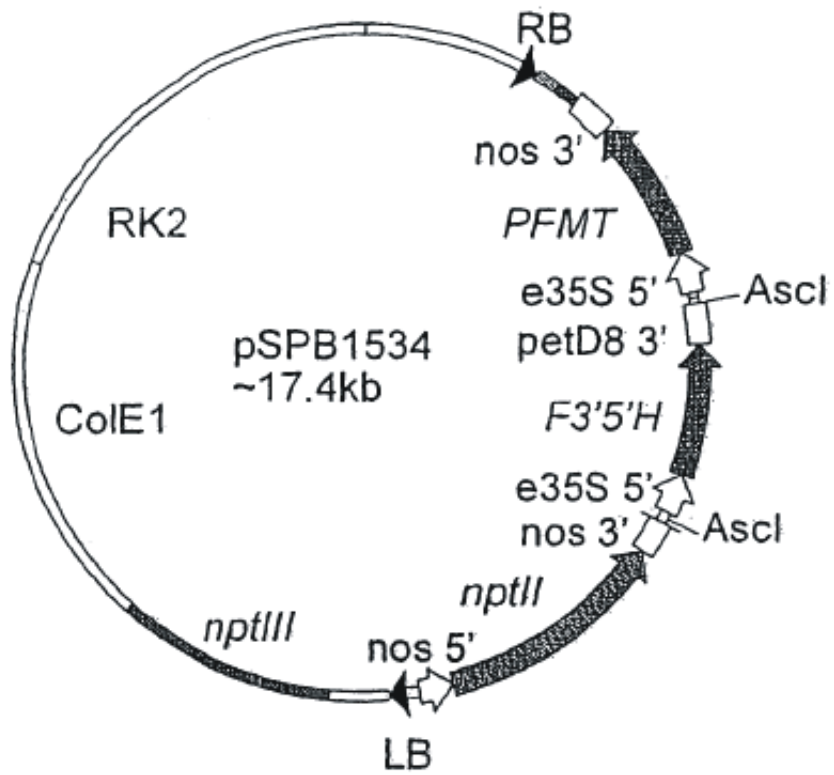
Figura 13



Replicón: pRTppoptc XbaI (romo)/EcoRI~3.3kb

Inserto: fragmento Asp718 (romo)/EcoRI ~1.8kb
de pCGP1961

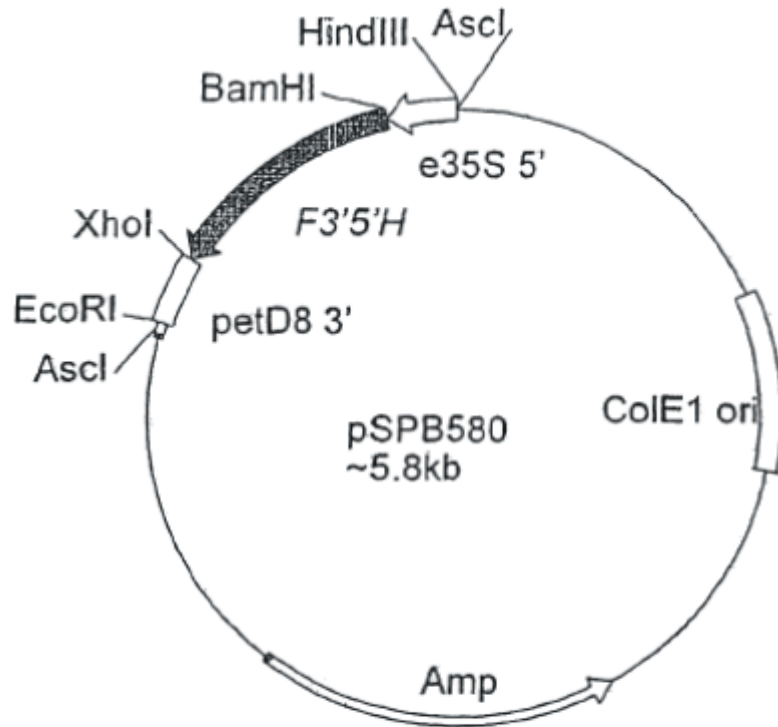
Figura 14



Replicón: pSPB1531 Ascl ~14.3kb

Inserto: fragmento Ascl ~3.1kb de pSPB580

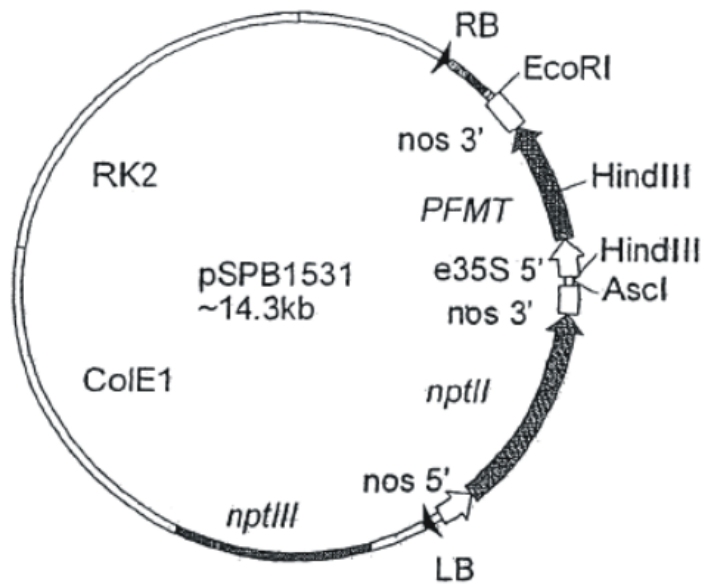
Figura 15



Replicón: pUCAPAsc BamHI/EcoRI ~2.7kb

Inserto: e35S 5': Viola F3'5'H cADN : petD8 3' ~3.1kb

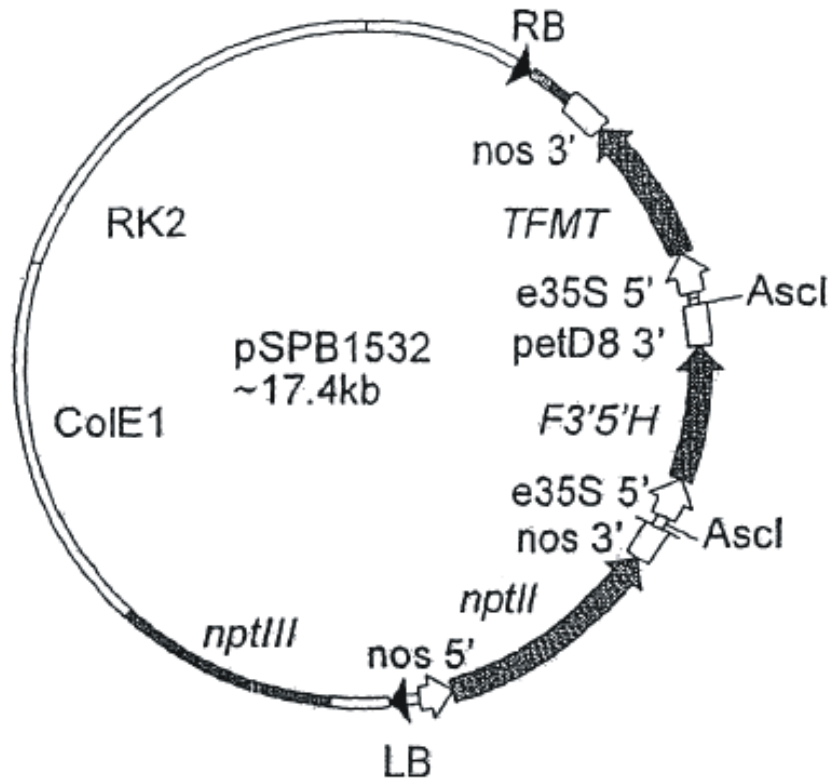
Figura 16



Replicón: fragmento pSPB176 BamHI/Sall ~13.5kb

Inserto: fragmento Petunia FMT cADN BamHI/XhoI
(derivados de pCGP1907) ~ 0.9kb

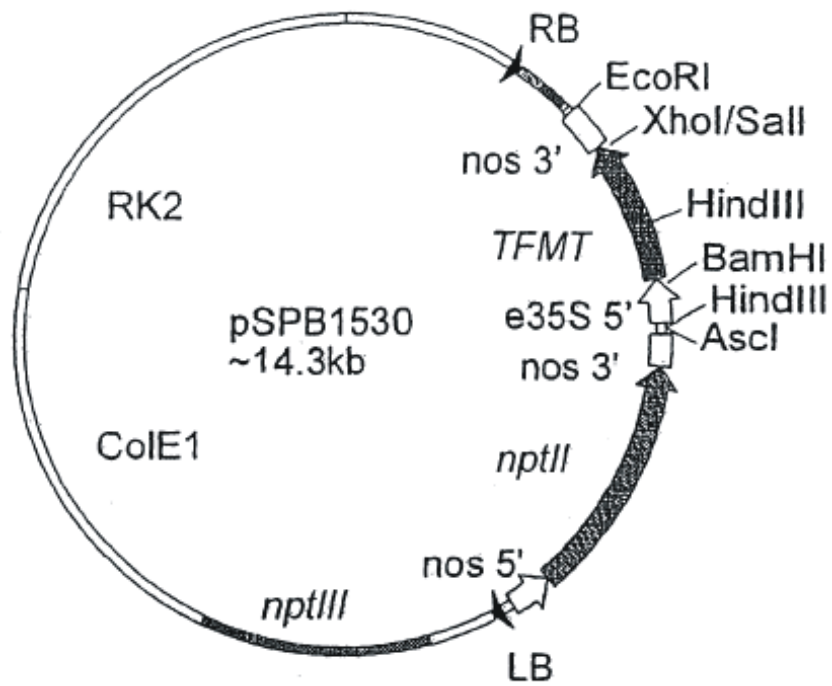
Figura 17



Replicón: pSPB1530 Ascl ~14.3kb

Inserto: fragmento Ascl ~3.1kb de pSPB580

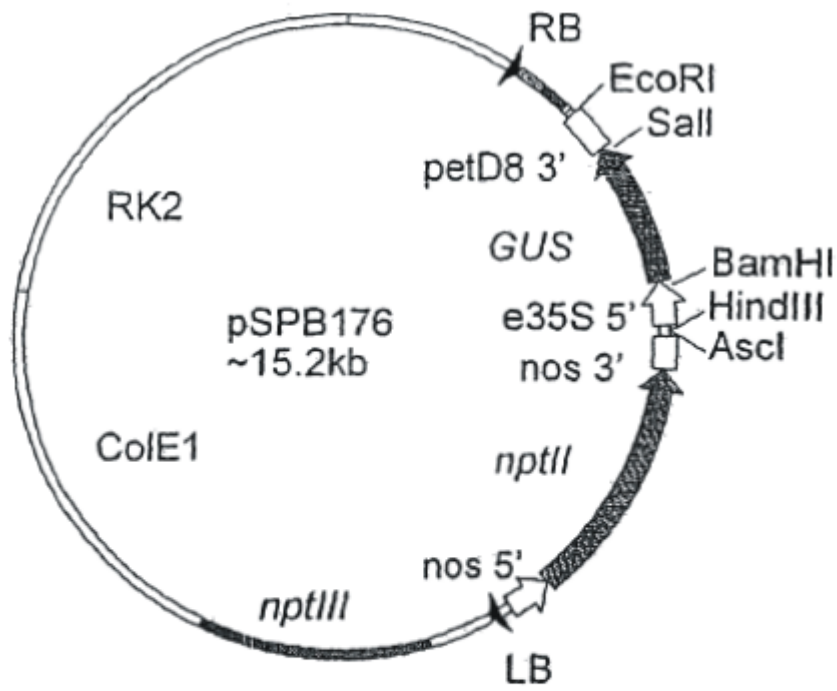
Figura 18



Replicón: fragmento pSPB176 BamHI/SalI ~13.4kb

Inserto: fragmento *Torenia* FMT cADN BamHI/XhoI (derivados de pTMT5) ~0.9kb

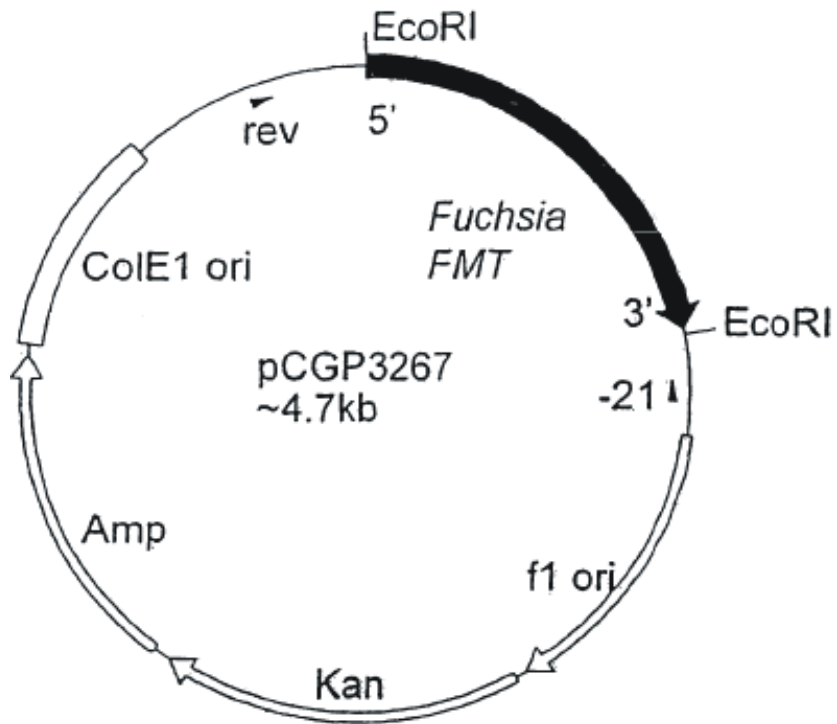
Figura 19



Replicón: pBINPLUS HindIII/EcoRI ~12.4kb

Inserto: fragmento HindIII/EcoRI
(derivado de pBE2113- Δ GUS) ~2.8kb

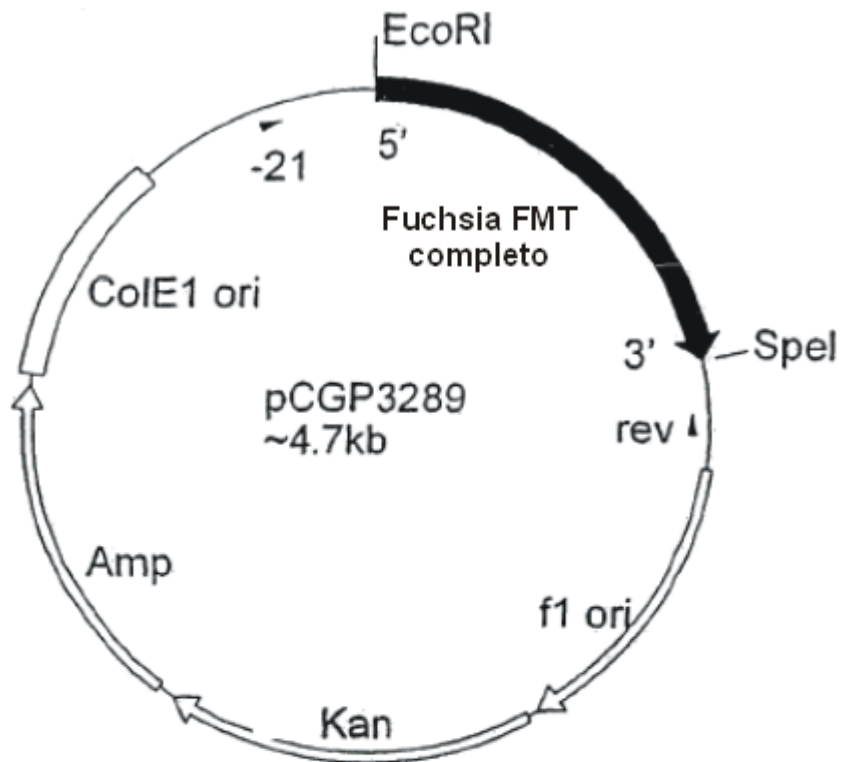
Figura 20



Replicón: pCR 2.1 3.9kb

Inserto: fragmento Fuchsia FMT 3'RACE ~0.8kb

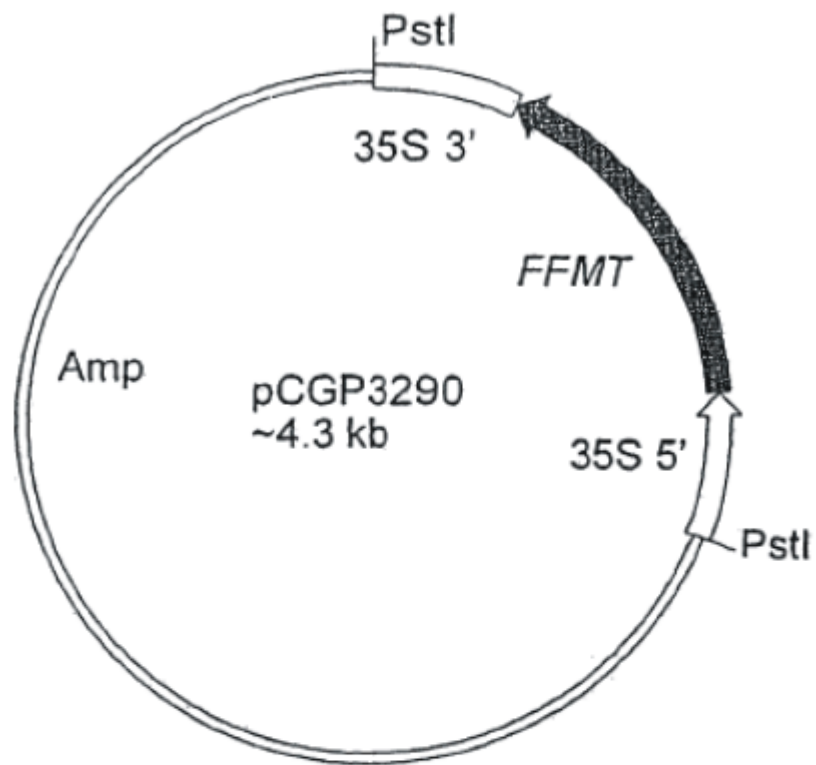
Figura 21



Replicón: pCR 2.1 3.9kb

Inserto: Fuchsia FMT completo cADN ~1,0kb

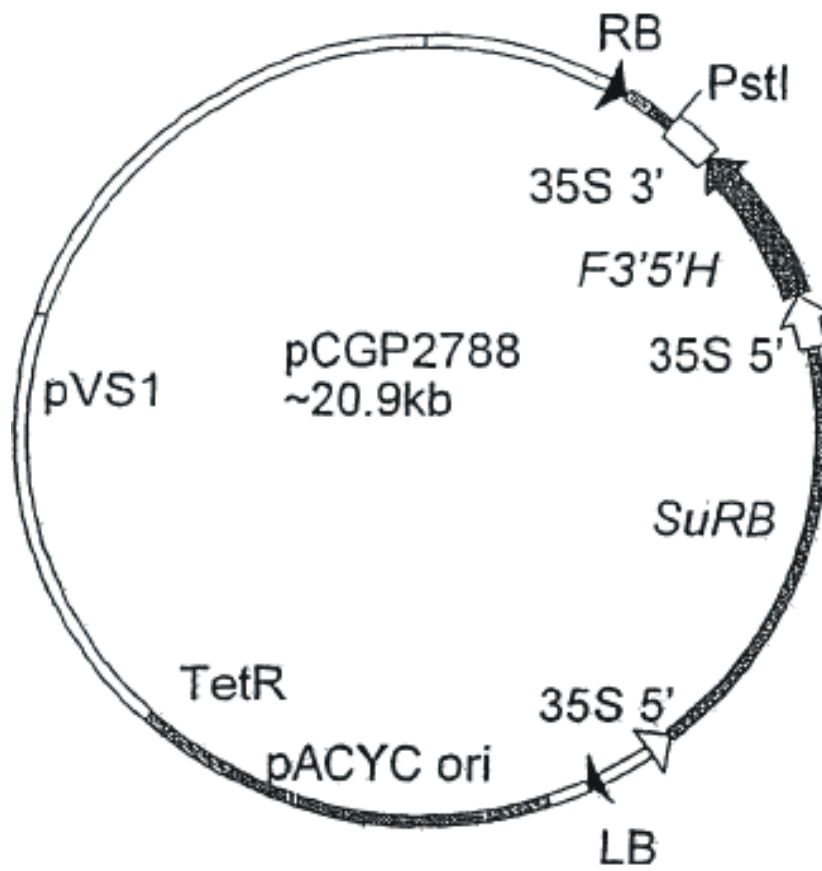
Figura 22



Replicón: pRT PPOPTC XbaI(ROMO)/EcoRI 3.3kb

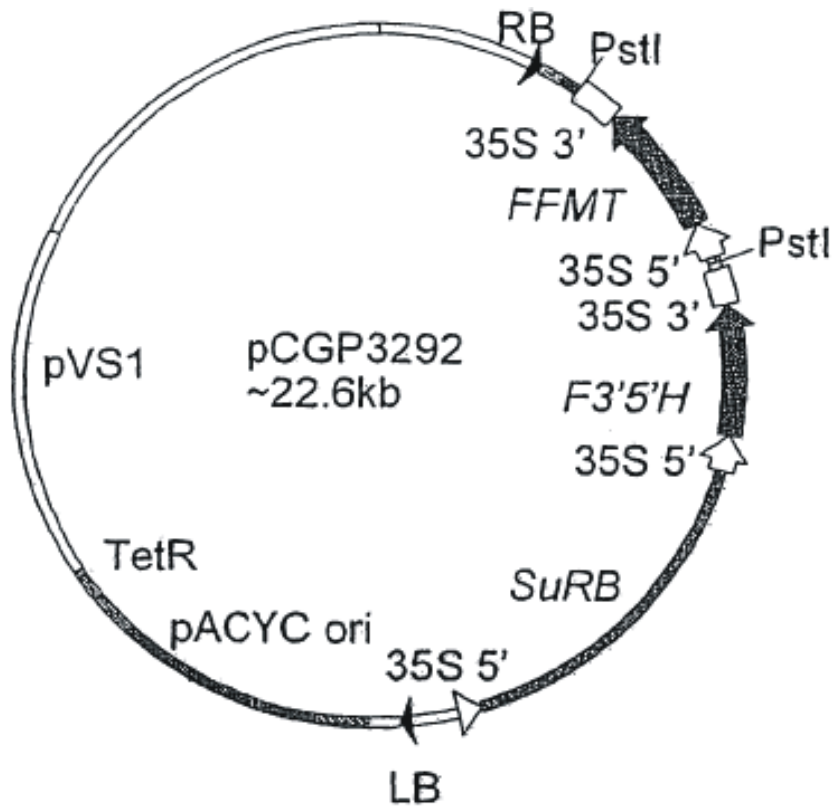
Inserto: fragmento SpeI (romo)/EcoRI ~ 1,0kb de pCGP3289

Figura 23



Replicón: pCGP3254 PstI ~20.9kb

Figura 24

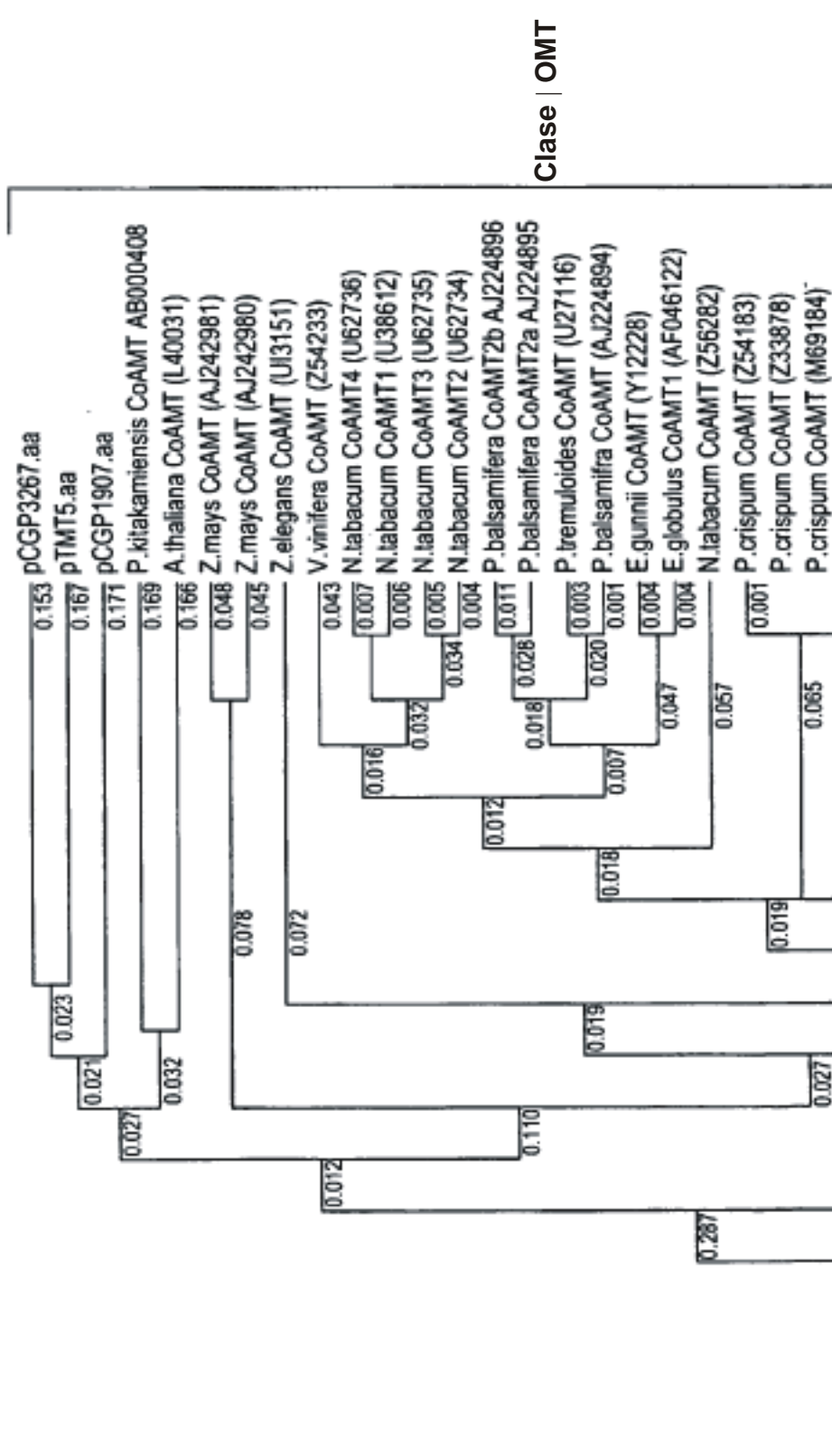


Replicón: pCGP2788 PstI ~20.9kb

Inserto: fragmento PstI ~1.7kb de pCGP3290

Figura 25

FIG. 26



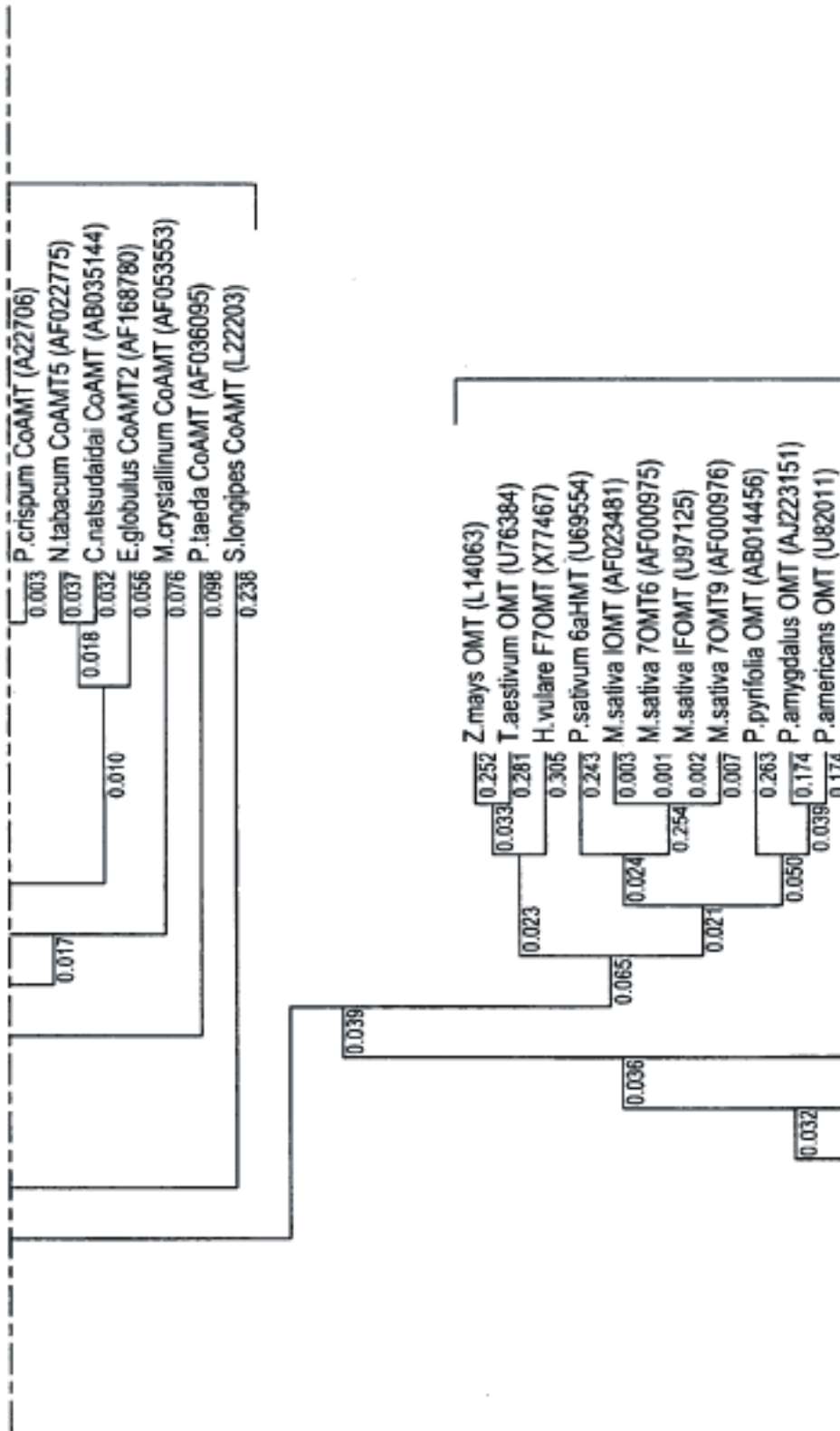
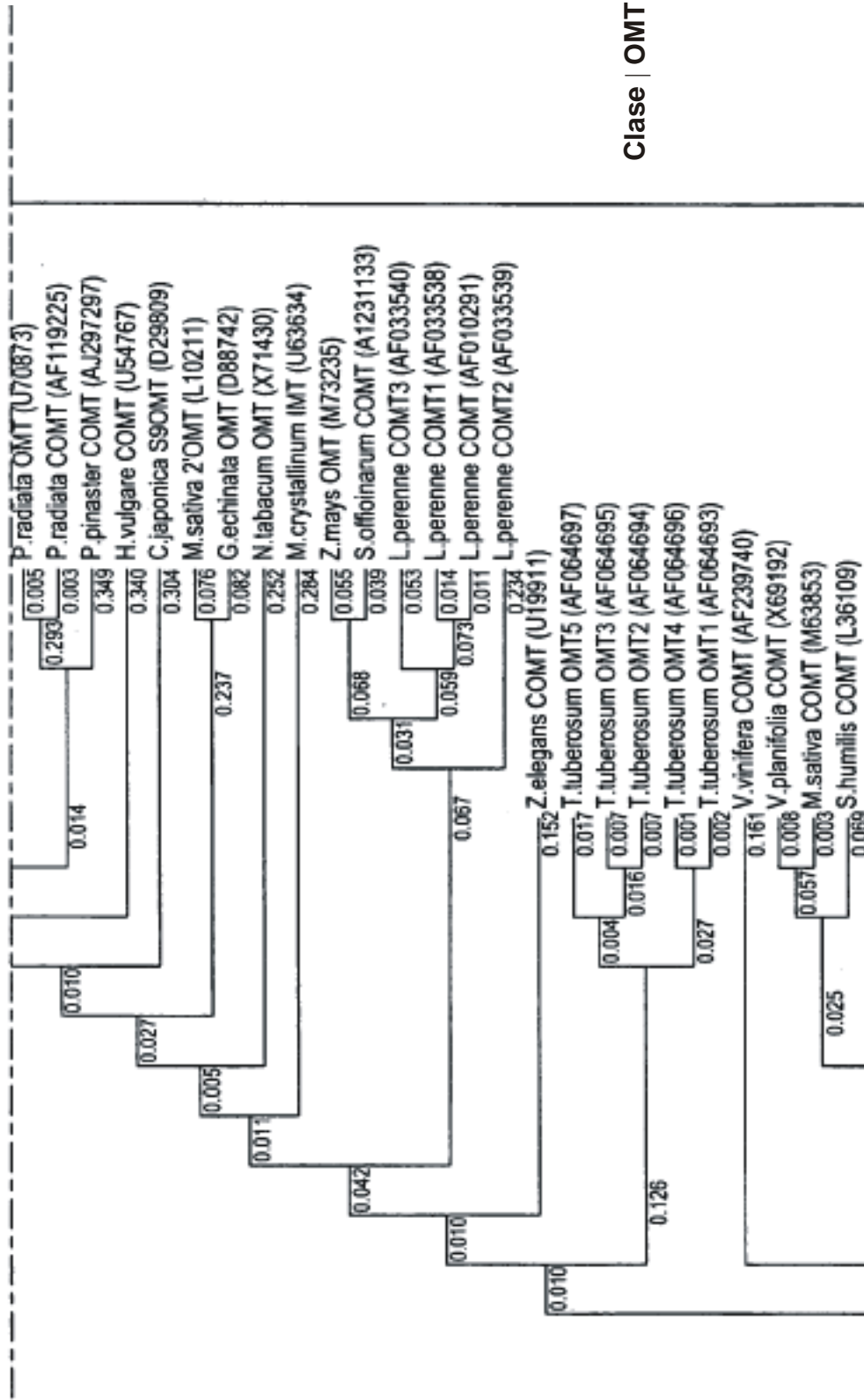


FIG. 26 CONTINUACIÓN



Clase | OMT

FIG. 26 CONTINUACIÓN

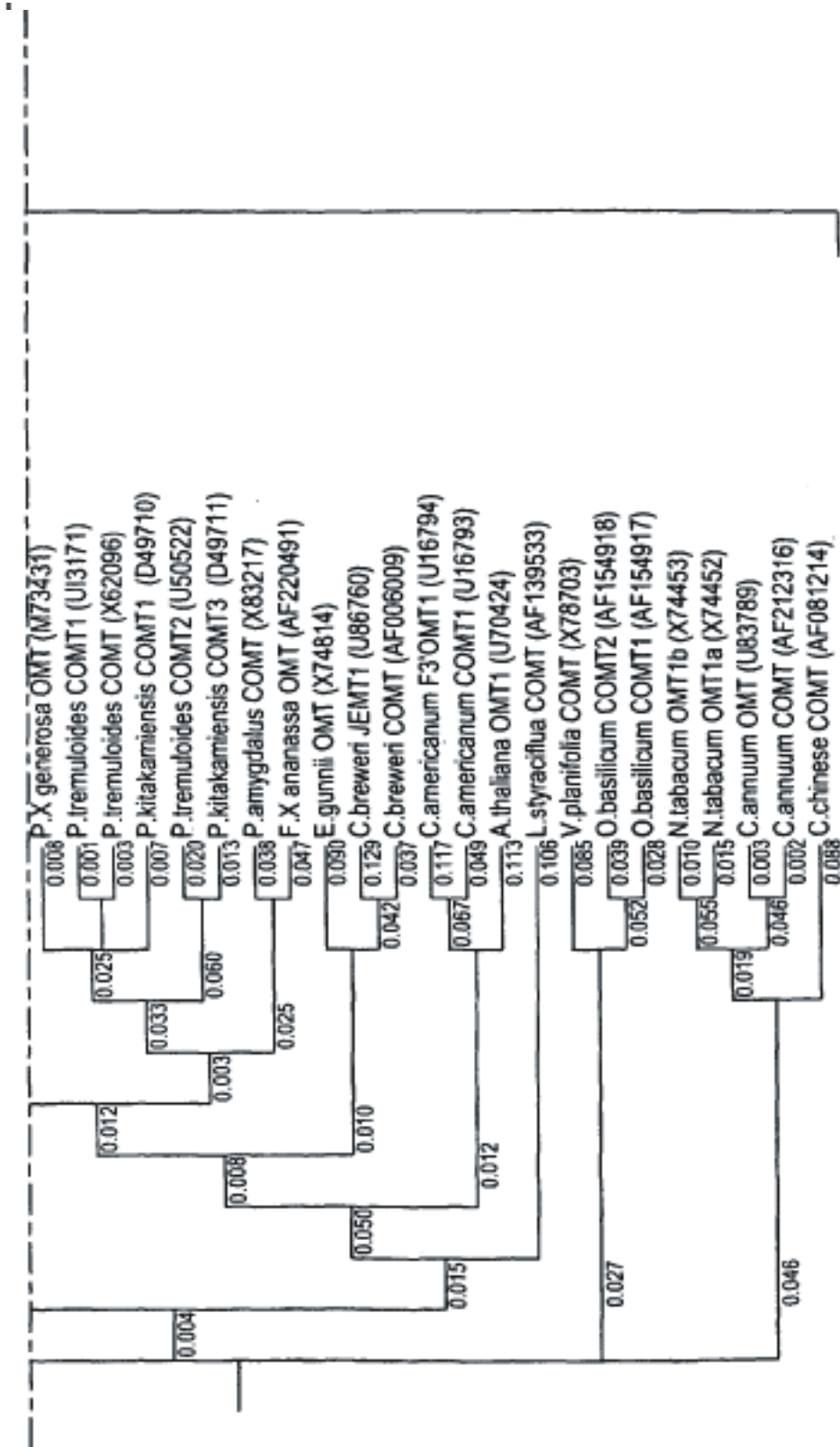


FIG. 26 CONTINUACIÓN