

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 755**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2011 PCT/GB2011/051121**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11161431**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2011 E 11736132 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2585479**

54 Título: **Ácidos nucleicos y polipéptidos de la metiltransferasa**

30 Prioridad:

22.06.2010 GB 201010471
22.12.2010 GB 201021720

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2020

73 Titular/es:

**SUN PHARMACEUTICAL INDUSTRIES
(AUSTRALIA) PTY LIMITED (100.0%)**
Level 4, 1 Acacia Place
Notting Hill VIC 3168, AU

72 Inventor/es:

WINZER, THILO HANS;
WALKER, TRACY CAROL y
GRAHAM, IAN ALEXANDER

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 742 755 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

Ácidos nucleicos y polipéptidos de la metiltransferasa

5 **Introducción**

Esta descripción se refiere al aislamiento y secuenciación de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de metiltransferasa de una variedad cultivada de *Papaver somniferum* [planta de amapola]; células transgénicas transformadas con dichas moléculas de ácido nucleico, variantes de secuencia de los genes; el uso de dichos genes/proteínas en la producción de noscapina y el uso de los genes como marcadores de plantas de amapola que sintetizan noscapina.

Antecedentes

15 La amapola de opio *P. somniferum* es la planta de la que se extrae el opio. La amapola de opio es la única amapola comercialmente explotada de la familia *Papaveraceae* y es la principal fuente de opiáceos naturales. El opio se extrae del látex cosechado de las vainas de semillas verdes. Otra fuente de alcaloides opiáceos es la paja de adormidera que es la planta madura seca. La *P. somniferum* es una fuente de alcaloides opiáceos clínicamente útiles como la morfina, la codeína, la tebaína, la noscapina [también conocida como narcotina] y papaverina. La aplicación clínica de estos alcaloides opiáceos y sus derivados es amplia y tiene uso como analgésicos, antitusígenos y antiespasmódicos.

20 Aunque no se usa como un agente farmacológico en sí mismo, la tebaína es un opiáceo particularmente útil que se puede convertir en una gama de compuestos tales como hidrocodona, oxicodona, oximorfona, naltrefina, naltrexona, buprenorfina y etorfina. Estos productos intermedios también tienen amplias aplicaciones farmacéuticas. Por ejemplo, oxicodona, oximorfona y etorfina se usan ampliamente como analgésicos para el dolor moderado a intenso y, a menudo, se combinan con otros analgésicos como el ibuprofeno. La buprenorfina se usa en el tratamiento de la adicción a la heroína y el dolor crónico. La naltrexona se usa en el tratamiento del alcohol y la adicción a los opiáceos.

El uso de la tebaína en la producción de estos compuestos es limitado, ya que la tebaína es un componente menor de los opiáceos extraídos de la paja de amapola y representa aproximadamente el 0,5-2 % del opio extraído de la paja seca. Se han desarrollado variedades mutantes de la *P. somniferum* a fin de obtener un contenido de tebaína y oripavina de al menos un 50 % en peso de la combinación alcaloide de morfina, codeína, tebaína y oripavina; véase el documento WO98/02033. Los medios alternativos para mejorar la producción de tebaína incluyen la pulverización de plantas de amapola con productos químicos reguladores del crecimiento que inhiben las vías biosintéticas de alcaloides para mejorar la producción de tebaína y otros alcaloides opiáceos.

35 Esta descripción se refiere a análisis moleculares de la expresión génica en variedades cultivadas de amapola que producen noscapina. La noscapina no tiene propiedades analgésicas significativas, pero se usa como un supresor de la tos y se está investigando como un agente anticancerígeno y en el tratamiento de pacientes con accidentes cerebrovasculares.

40 Sorprendentemente, hemos descubierto que ciertas variedades de variedades cultivadas de amapola tienen genes que son exclusivos de las variedades cultivadas que producen noscapina. Hemos clonado tres genes que tienen homología con las metiltransferasas.

45 La primera metiltransferasa, PSMT1, presenta una similitud de secuencia con la S-adenosil-L-metionina: Scoulerina-9-O-Metiltransferasa de la *Coptis japonica* (número de muestreo: Q39522.1, 61 % idéntica) y de la *Thalictrum flavum* (número de muestreo: AAU20770.1, 59 % idéntica). Se ha caracterizado la proteína de la *Coptis japonica* y se ha demostrado que cataliza la transferencia del grupo S-metilo de la S-adenosil-L-metionina al grupo 9-hidroxilo de la scoulerina para formar la tetrahidrocolumbamina (Sato y col. (1993) *Phytochem.* 32:659-664) que, a su vez, sirve como precursor para la síntesis de la mayoría de los alcaloides de protoberberina.

La segunda metiltransferasa, PSMT2, presenta similitud de secuencia con la S-adenosil-L-metionina: norcoclaurina-6-O-metiltransferasa de la *Coptis japonica* (número de muestreo: Q9LEL6, 42 % idéntica) que se ha demostrado que cataliza la transferencia del grupo S-metilo de S-adenosil-L-metionina al grupo 6-hidroxilo de la (S)-Norcoclaurina para formar la (S)-Colaurina (Morishige y col. (2000) *J. Biol. Chem.* 275(30): 23398-23405).

La tercera metiltransferasa, PSMT3, presenta similitud de secuencia con la S-adenosil-L-metionina: norcoclaurina-6-O-metiltransferasa de la *Papaver somniferum* (número de muestreo: AAQ01669, 80 % idéntica) y de la *Papaver bracteatum* (número de muestreo: ACO90232, 80 % idéntica). La proteína de *Papaver somniferum* se ha caracterizado y demostrado que cataliza la transferencia del grupo S-metilo de S-adenosil-L-metionina para catalizar la transferencia

del grupo S-metilo de S-adenosil-L-metionina al grupo 6-hidroxilo de la (S)-Norcoclorina para formar la (S)-Colaurina (Ounaron y col. (2003) 36:808-819).

Declaraciones de la invención

5 Según un aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido aislado seleccionado de entre el grupo que consiste en:

- 10 i) un polipéptido de metiltransferasa que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se representa en la figura 4a, 4b o 4c; o
- ii) un polipéptido modificado que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa en la figura 4a que ha retenido la actividad de metiltransferasa; o
- 15 iii) un polipéptido modificado que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa en la figura 4b que ha retenido la actividad de metiltransferasa; o
- iv) un polipéptido modificado que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa en la figura 4c que ha retenido la actividad de metiltransferasa.

20 En una realización preferida de la invención, dicho polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos en las figuras 4a, 4b o 4c.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de metiltransferasa donde dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- 30 i) una secuencia de nucleótidos representada por la secuencia en la figura 1a, 1b, 1c, 3a, 3b o 3c; o
- ii) una secuencia de nucleótidos donde dicha secuencia está degenerada como resultado del código genético de la secuencia de nucleótidos definida en el inciso (i) anterior;
- iii) una molécula de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con secuencias con al menos un 90 % de identidad con las secuencias representadas en la figura 1a o 3a donde dicha molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido de metiltransferasa; o
- 35 iv) una molécula de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con secuencias con al menos un 90 % de identidad con las secuencias representadas en la figura 1b, o 3b, donde dicha molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido de metiltransferasa; o
- v) una molécula de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con secuencias con al menos un 90 % de identidad con las secuencias representadas en la figura 1c o 3c, donde dicha molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido de metiltransferasa.

40 La hibridación de una molécula de ácido nucleico se produce cuando dos moléculas de ácido nucleico complementarias experimentan una cantidad de enlaces de hidrógeno entre sí. La rigurosidad de la hibridación puede variar según las condiciones ambientales que rodean a los ácidos nucleicos, la naturaleza del método de hibridación y la composición y longitud de las moléculas de ácido nucleico usadas. Los cálculos con respecto a las condiciones de hibridación requeridas para alcanzar grados particulares de rigor se discuten en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001); y Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes Part I, Capítulo 2 (Elsevier, Nueva York, 1993). La T_m es la temperatura a la que el 50 % de una cadena dada de una molécula de ácido nucleico se hibrida con su cadena complementaria. Lo siguiente es un conjunto ejemplar de condiciones de hibridación y no es restrictivo:

Rigor Muy Alto (permite secuencias que comparten al menos un 90 % de identidad para hibridar)

Hibridación:	5x SSC a 65 °C durante 16 horas
Lavar dos veces:	2x SSC a temperatura ambiente (RT) durante 15 minutos cada una
Lavar dos veces:	0,5x SSC a 65 °C durante 20 minutos cada una

55

Rigor alto (permite secuencias que comparten al menos un 80 % de identidad para hibridar)

Hibridación: 5x-6x SSC a 65-70 °C durante 16-20 horas
Lavar dos veces: 2x SSC a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada una
Lavar dos veces: 1x SSC a 55-70 °C durante 30 minutos cada una

Rigor Bajo (permite secuencias que comparten al menos un 50 % de identidad para hibridar)

5

Hibridación: 6x SSC a temperatura ambiente a 55 °C durante 16-20 horas
Lavar al menos dos veces: 2x-3x SSC a temperatura ambiente a 55 °C durante 20-30 minutos cada una

En una realización preferida de la invención, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 1a, 1b, 1c, 3a, 3b o 3c.

- 10 Un polipéptido modificado como se describe en esta invención puede diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones, truncamientos que pueden estar presentes en cualquier combinación. Entre las variantes preferidas están aquellas que varían de un polipéptido de referencia por sustituciones de aminoácidos conservadoras. Tales sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado por otro aminoácido de características similares. La siguiente lista no excluyente de aminoácidos se considera reemplazos conservadores (similares): a) alanina, serina y treonina; b) ácido glutámico y ácido aspártico; c) asparagina y glutamina d) arginina y lisina; e) isoleucina, leucina, metionina y valina y f) fenilalanina, tirosina y triptófano. Las más preferidas son las variantes que retienen o potencian la misma función y actividad biológica que el polipéptido de referencia del que varía.

- 20 Describimos polipéptidos variantes que tienen al menos un 43 % de identidad, más preferentemente al menos un 62 % de identidad, incluso más preferentemente al menos un 70 % de identidad, aún más preferentemente al menos un 75, 80, 85 o 90 %, con la secuencia de aminoácido de longitud completa ilustrada en esta invención.

- 25 En una realización preferida de la invención, los polipéptidos variantes tienen al menos un 95 % de identidad, y lo más preferentemente al menos un 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de longitud completa ilustrada en esta invención.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una metiltransferasa según la invención donde dicha molécula de ácido nucleico está operativamente unida con una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora.

30

En una realización preferida de la invención, dicha secuencia de ácido nucleico que comprende un promotor confiere una expresión constitutiva a dicha metiltransferasa.

- 35 En una realización alternativa preferida de la invención, dicha secuencia de ácido nucleico que comprende un promotor confiere una expresión regulada en dicha metiltransferasa.

En una realización preferida de la invención, dicha expresión regulada es tejido o una expresión regulada por el desarrollo.

- 40 En una realización alternativa adicional de la invención, dicha expresión regulada es una expresión inducible.

En una realización alternativa de la invención, un vector que incluye un ácido nucleico según la invención no necesita incluir un promotor u otra secuencia reguladora, particularmente si el vector se va a usar para introducir el ácido nucleico en células para una recombinación en el gen.

45

Preferentemente, el ácido nucleico en el vector está bajo el control de, y operativamente unida a, un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la transcripción en una célula huésped tal como una célula microbiana (por ejemplo, bacteriana, de levadura) o vegetal. El vector puede ser un vector de expresión bifuncional que funciona en múltiples huéspedes. En el caso del ADN genómico de la metiltransferasa, este puede contener su propio promotor u otros elementos reguladores y, en el caso del ADNc, puede estar bajo el control de un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la expresión en la célula huésped.

50

Por "promotor" se entiende una secuencia de nucleótidos ascendente del sitio de iniciación de la transcripción y que contiene todas las regiones reguladoras requeridas para la transcripción. Los promotores adecuados incluyen

promotores constitutivos, específicos de tejido, inducibles, de desarrollo u otros promotores para la expresión en células vegetales comprendidas en plantas que dependen del diseño. Tales promotores incluyen promotores virales, fúngicos, bacterianos, animales y derivados de plantas capaces de funcionar en células vegetales.

- 5 Los promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor CaMV 35S (Odell y col. (1985) *Nature* 313: 9810-812); la actina de arroz (McElroy y col. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); la ubiquitina (Christian y col. (1989) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689); pEMU (Last y col. (1991) *Theor Appl. Genet.* 81: 581-588); MAS (Velten y col. (1984) *EMBO J.* 3: 2723-2730); el promotor ALS (Solicitud de serie de los EE.UU. No. 08/409.297) y similares. Otros promotores constitutivos incluyen aquellos de las Patentes de los EE.UU. No. 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 10 5.399.680, 5.268.463; y 5.608.142.

- Los promotores regulados químicamente se pueden usar para modular la expresión de un gen en una planta mediante la aplicación de un regulador químico exógeno. Dependiendo del objetivo, el promotor puede ser un promotor inducible por productos químicos, donde la aplicación de la expresión génica inducida por productos químicos, o un promotor 15 reprimible químico, donde la aplicación del químico reprime la expresión génica. Los promotores inducibles por productos químicos son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, el promotor In2-2 de maíz, que se activa mediante herbicidas benzenesulfonamida, el promotor GST de maíz, que se activa mediante compuestos electrofílicos hidrófobos que se usan como pre-herbicidas de emergencia, y el promotor de tabaco PR-1a, que se activa con ácido salicílico. Otros promotores regulados químicamente de interés incluyen promotores que responden a esteroides (véase, por ejemplo, el promotor inducible por glucocorticoides en Schemm y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88: 10421-10425 y McNellis y col. (1998) *Plant J.* 14(2): 247-257) y promotores inducibles por tetraciclina y represores de tetraciclina (véase, por ejemplo, Gatz y col. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227: 229-237 y las Patentes de los EE.UU. No. 5.814.618 y 5.789.156.

- 25 Cuando se desea una expresión mejorada en tejidos particulares, pueden usarse promotores específicos de tejido. Los promotores específicos de tejido incluyen los descritos por Yamamoto y col. (1997) *Plant J.* 12 (2): 255-265; Kawamata y col. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7): 792-803; Hansen y col. (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3): 337-343; Russell y col. (1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168; Rinehart y col. (1996) *Plant Physiol.* 112 (3): 1331-1341; Van Camp y col. (1996) *Plant Physiol.* 112(2): 525-535; Canevascni y col. (1996) *Plant Physiol.* 112(2): 513-524; Yamamoto 30 y col. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5): 773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 181-196; Orozco y col. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6): 1129-1138; Mutsuoka y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90 (20): 9586-9590; y Guevara-García y col (1993) *Plant J.* 4(3): 495-50.

- "Unido operativamente" significa unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, adecuadamente 35 posicionado y orientado para que se inicie la transcripción a partir del promotor. El ADN operativamente unido a un promotor está "bajo la regulación de iniciación transcripcional" del promotor. En un aspecto preferido, el promotor es un promotor específico de tejido, un promotor inducible o un promotor regulado en el desarrollo.

- Lo que resulta de particular interés en el presente contexto son las construcciones de ácidos nucleicos que funcionan 40 como vectores de plantas. Los procedimientos y vectores específicos usados previamente con gran éxito en las plantas son descritos por Guerineau y Mullineaux (1993) (*Plant transformation and expression vectors*. En: *Plant Molecular Biology Labfax* (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, páginas 121-148. Los vectores adecuados pueden incluir vectores derivados de plantas víricas (véase, por ejemplo, el documento EP194809).

- 45 Si se desea, pueden incluirse marcadores genéticos seleccionables en la construcción, tales como aquellos que confieren fenotipos seleccionables tales como resistencia a herbicidas (por ejemplo, kanamicina, higromicina, fosfotricina, clorsulfurón, metotrexato, gentamicina, espectinomina, imidazolinonas y glifosato).

- Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una célula vegetal transgénica transformada o transfectada 50 con una molécula o vector de ácido nucleico según la invención.

En una realización preferida de la invención, dicha célula vegetal es una célula de la familia *Papaveraceae*.

- En una realización preferida de la invención, dicha célula vegetal es una célula *Papaver somniferum*. 55

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una planta que comprende una célula vegetal según la invención.

- En una realización preferida de la invención, dicha planta es de la familia *Papaveraceae*; preferentemente *Papaver 60 somniferum*.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una célula microbiana transgénica transformada o transfectada con una molécula o vector de ácido nucleico según la invención.

- 5 En una realización preferida de la invención, dicha célula es una célula bacteriana o fúngica [por ejemplo, levadura, *Saccharomyces cerevisiae*].

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un casete de transcripción, donde dicho casete incluye una secuencia de nucleótidos diseñada con referencia a las figuras 1a, 10 1b, 1c, 3a, 3b o 3c y se adapta para la expresión mediante la provisión de al menos un promotor unido operativamente a dicha secuencia de nucleótidos de manera que tanto las moléculas con sentido como las antisentido se transcriban desde dicho casete.

En una realización preferida de la invención, dicho casete está adaptado de tal manera que las moléculas de ácido 15 nucleico sentido y antisentido se transcriban desde dicho casete, donde dichas moléculas de ácido nucleico sentido y antisentido están adaptadas para hibridar al menos parte o la totalidad de su longitud para formar un ARNip o ARNhc.

En una realización preferida de la invención, dicho casete está provisto de al menos dos promotores adaptados para 20 transcribir cadenas sentido y antisentido de dicha molécula de ácido nucleico.

En una realización preferida alternativa de la invención, dicho casete comprende una molécula de ácido nucleico donde dicha molécula comprende una primera parte unida a una segunda parte donde dichas primera y segunda partes son 25 complementarias de al menos parte de su secuencia y donde una transcripción adicional de dicho ácido nucleico la molécula produce una molécula de ARN que forma una región bicatenaria por apareamiento de bases complementarias de dichas primera y segunda partes, formando así un ARNhc.

Una técnica para eliminar específicamente la función génica es a través de la introducción de ARN bicatenario, también denominado ARN inhibidor/interferente pequeño (ARNip) o ARN de horquilla corta [ARNhc], en una célula, lo que 30 resulta en la destrucción del ARNm complementario a la secuencia incluido en la molécula de ARNip/ARNhc. La molécula de ARNip comprende dos cadenas complementarias de ARN (una cadena sentido y una cadena antisentido) hibridadas entre sí para formar una molécula de ARN bicatenario. La molécula de ARNip se deriva típicamente de los exones del gen que se debe extirpar. El mecanismo de interferencia de ARN se está dilucidando. Muchos organismos responden a la presencia de ARN bicatenario activando una cascada que conduce a la formación de ARNip. La presencia de ARN bicatenario activa un complejo proteico que comprende RNasa III que procesa el ARN bicatenario 35 en fragmentos más pequeños (ARNip, de aproximadamente 21 a 29 nucleótidos de longitud) que se convierten en parte de un complejo de ribonucleoproteína. El ARNip actúa como una guía para el complejo RNase para escindir ARNm complementario a la cadena antisentido del ARNip, lo que resulta en la destrucción del ARNm.

En una realización preferida de la invención, dicha molécula de ácido nucleico es parte de un vector adaptado para la 40 expresión en una célula vegetal.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una célula vegetal transfectada con una molécula de ácido nucleico o vector según la invención donde dicha célula tiene una expresión reducida de dicha metiltransferasa.

- 45 Según un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la metilación de un alcaloide opiáceo que comprende:

- i) proporcionar una célula vegetal transgénica según la invención;
 - ii) cultivar dicha célula vegetal para producir una planta transgénica; y opcionalmente
- 50 i) cosechar dicha planta transgénica, o parte de la misma.

En un procedimiento preferido de la invención, dicho material vegetal cosechado es paja seca y se extrae dicho alcaloide opiáceo.

- 55 Según un aspecto alternativo de la invención, se proporciona un procedimiento para la metilación de un alcaloide opiáceo que comprende:

- i) proporcionar una célula microbiana transgénica según la invención que expresa una metiltransferasa según la invención en un cultivo con al menos un alcaloide opiáceo;
- 60 ii) cultivar la célula microbiana en condiciones que metilan uno o más alcaloides opiáceos; y opcionalmente

iii) aislar dicho alcaloide metilado de la célula microbiana o cultivo celular.

En un procedimiento preferido de la invención, dicha célula microbiana es una célula bacteriana o una célula fúngica/de levadura.

5

Si se usan células microbianas como organismos en el procedimiento según la invención, se cultivarán o desarrollarán de la manera en que el experto en la técnica esté familiarizado, dependiendo del organismo huésped. Como norma, los microorganismos se cultivan en un medio líquido que comprende una fuente de carbono, generalmente en forma de azúcares, una fuente de nitrógeno, generalmente en forma de fuentes de nitrógeno orgánico, como el extracto de levadura o sales como el sulfato de amonio, elementos traza tales como sales de hierro, manganeso y magnesio y, si corresponde, vitaminas, a temperaturas entre 0 y 100 °C, preferentemente entre 10 y 60 °C, mientras se gasea en oxígeno.

El pH del medio líquido puede mantenerse constante, es decir, regulado durante el período de cultivo, o no. Los cultivos se pueden cultivar por lotes, por semi-lotes o de forma continua. Pueden proporcionarse nutrientes al comienzo de la fermentación o bien proporcionarse de forma semicontinua o continua. Los alcaloides opiáceos metilados producidos se pueden aislar de los organismos como se describió anteriormente, usando procedimientos conocidos por el experto, por ejemplo, mediante extracción, destilación, cristalización, si es apropiado, precipitación con sal y/o cromatografía. Con este fin, los organismos pueden ser interrumpidos ventajosamente de antemano. En este procedimiento, el valor de pH se mantiene ventajosamente entre pH 4 y 12, preferentemente entre pH 6 y 9, especialmente preferentemente entre pH 7 y 8.

El medio de cultivo a usar debe cumplir adecuadamente los requisitos de las cepas en cuestión. Pueden encontrarse descripciones de los medios de cultivo para varios microorganismos en el libro de texto "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU., 1981).

Como se ha descrito anteriormente, estos medios que pueden emplearse según la invención comprenden usualmente una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o elementos traza.

Las fuentes de carbono preferidas son azúcares, tales como mono, di o polisacáridos. Ejemplos de fuentes de carbono son glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. Los azúcares también se pueden agregar a los medios a través de compuestos complejos como la melaza u otros subproductos del refinado de azúcar. También puede resultar ventajosa la adición de mezclas de una variedad de fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y/o grasa de coco, ácidos grasos como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y/o ácido linoleico, alcoholes y/o polialcoholes tales como, por ejemplo, glicerol, metanol y/o etanol, y/o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético y/o ácido láctico.

Las fuentes de nitrógeno son generalmente compuestos de nitrógeno orgánicos o inorgánicos o materiales que comprenden estos compuestos. Ejemplos de fuentes de nitrógeno son amoníaco en forma líquida o gaseosa o sales de amonio tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes de nitrógeno complejas tales como licor de maíz, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno se pueden usar individualmente o como una mezcla.

45

Los compuestos de sales inorgánicas que pueden estar presentes en los medios comprenden las sales de cloruro, fósforo y sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, zinc, cobre y hierro.

Los compuestos inorgánicos que contienen azufre tales como, por ejemplo, sulfatos, sulfitos, ditionitos, tetracionatos, tiosulfatos, sulfuros, o bien compuestos orgánicos de azufre tales como mercaptanos y tioles pueden usarse como fuentes de azufre para la producción de químicos que contienen sulfuro, en particular de metionina.

Como fuentes de fósforo se pueden usar ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato dipotásico o las sales correspondientes que contienen sodio.

55

Se pueden añadir agentes quelantes al medio para mantener los iones metálicos en la solución. Los agentes quelantes particularmente adecuados comprenden dihidroxifenoles tales como catecol o protocatecuato y ácidos orgánicos tales como ácido cítrico.

Los medios de fermentación usados según la invención para cultivar microorganismos también comprenden

habitualmente otros factores de crecimiento tales como vitaminas o promotores del crecimiento, que incluyen, por ejemplo, biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y las sales se derivan frecuentemente de componentes de medios complejos tales como extracto de levadura, melaza, licor de maíz y similares. Además, es posible añadir precursores adecuados al medio de cultivo. La composición exacta de los compuestos de los medios depende en gran medida del experimento particular y se decide individualmente para cada caso específico. Se puede encontrar información sobre la optimización de los medios en el libro "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Editors P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) páginas 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Los medios de crecimiento también pueden obtenerse de proveedores comerciales, por ejemplo, Standard 1 (Merck) o BHI (infusión de cerebro-corazón, DIFCO) y similares.

10 Todos los componentes del medio se esterilizan, ya sea por calor (20 min a 1,5 bar y 121 °C) o por esterilización por filtro. Los componentes pueden esterilizarse juntos o, si es necesario, por separado. Todos los componentes de los medios pueden estar presentes al inicio del cultivo o agregarse de forma continua o por lotes, según se desee.

15 La temperatura del cultivo normalmente se encuentra entre 15 y 45 °C, preferentemente entre 25 y 40 °C, y puede mantenerse constante o alterarse durante el experimento. El pH del medio debe estar en el rango de 5 a 8,5, preferentemente alrededor de 7,0. El pH para el cultivo puede controlarse durante el cultivo mediante la adición de compuestos básicos como el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio, el amoníaco y el amoníaco acuoso o compuestos ácidos como el ácido fosfórico o el ácido sulfúrico. La formación de espuma se puede controlar empleando

20 antiespumantes tales como, por ejemplo, ésteres de poliglicol de ácidos grasos. Para mantener la estabilidad de los plásmidos, es posible añadir al medio sustancias adecuadas que tengan un efecto selectivo, por ejemplo, antibióticos. Las condiciones aeróbicas se mantienen introduciendo oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno como, por ejemplo, aire ambiente en el cultivo. La temperatura del cultivo es normalmente de 20 a 45 °C y preferentemente de 25 a 40 °C. El cultivo continúa hasta que la formación del producto deseado está al máximo. Este objetivo se logra

25 normalmente en un período de 10 a 160 horas.

Entonces, el caldo de fermentación puede procesarse adicionalmente. La biomasa puede, según el requisito, eliminarse total o parcialmente del caldo de fermentación mediante métodos de separación tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, decantación o una combinación de estos métodos, o puede dejarse por completo en dicho

30 caldo. Resulta ventajoso procesar la biomasa después de su separación.

Sin embargo, el caldo de fermentación también puede espesarse o concentrarse sin separar las células, usando procedimientos conocidos como, por ejemplo, con la ayuda de un evaporador rotatorio, un evaporador de película delgada, un evaporador de película descendente, mediante ósmosis inversa o nanofiltración. Por último, este caldo de

35 fermentación concentrado puede procesarse para obtener los alcaloides opiáceos presentes en él.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un gen codificado por una molécula de ácido nucleico como se representa mediante la secuencia de ácido nucleico en la figura 3a, 3b o 3c, o una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación muy estrictas para la secuencia de nucleótidos en la figura 3a,

40 3b o 3c y codifica un polipéptido con actividad de metiltransferasa como un medio para identificar la presencia o ausencia de un gen que codifica dicha metiltransferasa en una planta de *Papaveraceae*.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un gen según la invención en una variedad de *Papaveraceae* que comprende:

- 45
- i) obtener una muestra de una planta de *Papaveraceae*;
 - ii) extraer ADN genómico de la planta; y
 - iii) analizar el ADN genómico en búsqueda de la presencia de un gen que comprende o que consiste en una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 3a, 3b o 3c.

50 Los procedimientos para analizar el ADN genómico son bien conocidos en la técnica. Un ejemplo son los procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa que usan cebadores oligonucleotídicos específicos de secuencia para amplificar regiones específicas del gen según la invención. El análisis de extracción, aislamiento y restricción con el uso de endonucleasas de restricción específicas de secuencia, seguido por la separación y transferencia Southern para analizar la estructura genómica, se ha establecido durante más de treinta años. El análisis

55 puede dirigirse a la estructura intrón o exón o a las regiones ascendentes o descendentes del gen; por ejemplo, regiones promotoras.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un gen codificado por una molécula de ácido nucleico como se representa mediante la secuencia de ácido nucleico en la figura 3a, 3b o 3c, o una molécula de ácido

60

nucleico que es un 90 % idéntica y que hibrida, bajo condiciones estrictas de hibridación, a la secuencia de nucleótidos en la figura 3a, 3b o 3c y codifica un polipéptido con actividad de metiltransferasa como un medio para identificar un locus donde dicho locus está asociado a una expresión o actividad alterada de dicha metiltransferasa.

- 5 La mutagénesis como medio para inducir cambios fenotípicos en los organismos es bien conocida en la técnica e incluye, entre otros, el uso de agentes mutagénicos tales como mutágenos químicos [por ejemplo, análogos de bases, agentes desaminantes, agentes intercaladores de ADN, agentes alquilantes, transposones, bromo, azida de sodio] y mutágenos físicos [por ejemplo, radiación ionizante, exposición al psoraleno combinada con radiación UV].
- 10 Describimos un procedimiento para producir una variedad vegetal de *Papaveraceae* que ha alterado la expresión de una metiltransferasa según la invención que comprende las etapas de:
- i) mutagénesis de semillas de tipo silvestre de una planta que expresa dicha metiltransferasa;
 - ii) cultivo de la semilla en el inciso i) para producir las primeras y posteriores generaciones de las plantas;
 - 15 iii) obtención de semillas de la planta de primera generación y las generaciones posteriores de las plantas;
 - iv) determinar si la semilla de dichas primeras y posteriores generaciones de plantas ha alterado la secuencia de nucleótidos y/o la expresión de dicha metiltransferasa;
 - v) obtener una muestra y analizar la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- 20
- a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 3a, 3b o 3c;
 - b) una molécula de ácido nucleico que se hibrida con la molécula de ácido nucleico en a) bajo condiciones de hibridación rigurosas y que codifica un polipéptido con actividad de metiltransferasa; y opcionalmente
- 25
- vi) comparar la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico en dicha muestra con una secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de la planta original de tipo silvestre.
- Según otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para el análisis de una planta de *Papaver* mutageneizada que comprende:
- 30
- i) obtener una muestra de la planta mutageneizada y analizar la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- 35
- a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 3a, 3b o 3c;
 - b) una molécula de ácido nucleico que se hibrida con la molécula de ácido nucleico en a) bajo condiciones de hibridación muy rigurosas y que codifica un polipéptido según la reivindicación 1; y
 - c) comparar la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico en dicha muestra con una secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de la planta original de tipo silvestre; por
- 40
- ii) extraer ácido nucleico de dichas plantas mutadas;
 - iii) amplificar una parte de dicha molécula de ácido nucleico mediante una reacción en cadena de polimerasa;
 - iv) formar una preparación que comprende el ácido nucleico amplificado y el ácido nucleico extraído de la semilla de tipo silvestre para formar ácido nucleico heterodúplex;
 - 45 v) incubar dicha preparación con una nucleasa monocatenaria que corta en una región de ácido nucleico heterodúplex para identificar el desfase en dicho heterodúplex; y
 - vi) determinar el sitio del desfase en dicho heterodúplex de ácido nucleico.
- 50 En un método preferido de la invención dicha variedad de planta *Papaveraceae* ha mejorado la expresión y/o la actividad de la metiltransferasa.
- Describimos una planta obtenida mediante el procedimiento según la invención.
- 55 Según un aspecto de la invención, se proporciona una planta, donde dicha planta comprende un vector viral que incluye un gen que comprende una molécula de ácido nucleico según la invención.
- En una realización preferida de la invención, dicho gen está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 1a, 1b o 1c.
- 60

En una realización preferida de la invención, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 1a.

5 En una realización preferida de la invención, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 1b.

En una realización preferida de la invención, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 1c

10 En una realización preferida de la invención, dicha molécula de ácido nucleico consiste en una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 14.

En una realización alternativa preferida de la invención, dicha molécula de ácido nucleico consiste en una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 15.

15 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la invención.

20 Según un aspecto de la invención, se proporciona el uso de un vector viral según la invención en el silenciamiento génico inducido por virus en una planta.

En una realización preferida de la invención, dicha planta es de la familia de *Papaveraceae*.

25 El silenciamiento génico inducido por virus [VIGS] es conocido en la técnica y explota un mecanismo de defensa antiviral mediado por ARN. Las plantas que están infectadas con un virus no modificado inducen un mecanismo que se dirige específicamente al genoma viral. Sin embargo, los vectores virales que están diseñados para incluir moléculas de ácido nucleico derivadas de genes de la planta huésped también inducen una inhibición específica de la expresión del vector viral y además se dirigen al ARNm del huésped. Esto permite silenciar genes específicos de genes sin modificación genética del genoma de la planta y es esencialmente una modificación no transgénica.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, las palabras "comprenden" y "contienen" y las variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significan "que incluye pero no se limita a", y no pretende (ni efectivamente) excluye otros restos, aditivos, componentes, enteros o etapas.

35 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, la especificación debe entenderse como que contempla la pluralidad y la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

40 Los elementos, los números enteros, las características, los compuestos o los restos químicos descritos junto con un aspecto, realización o ejemplo específico de la invención se deben entender como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en la presente, a menos que sean incompatibles con los mismos.

Ahora se describirá una realización de la invención solo a modo de ejemplo y con referencia a las siguientes figuras:

45 la figura 1a es la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la *PSMT1*; la figura 1b es la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la *PSMT2*; la figura 1c es la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la *PSMT3*

50 la figura 2: Expresión del gen de SAM-Scoulerina-9-O-metiltransferasa de la *P. somniferum* (*PSMT1*). Las bibliotecas de etiquetas de secuencias expresadas (EST) se generaron por pirosecuenciación usando bibliotecas de ADNc preparadas a partir de tallos (S) y cápsulas (C) en dos etapas de desarrollo de "cosecha temprana" (EH, 1 a 3 días después de la caída de los pétalos) y "cosecha tardía" (LH, 4 a 6 días después de que los pétalos se hayan caído) de cada una de las cuatro variedades cultivadas de *P. somniferum*: GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBÁINA CVS1;

55 la figura 3a es la secuencia de nucleótidos genómica de la *PSMT1*; la figura 3b es la secuencia de nucleótidos genómica de la *PSMT2*; la figura 3c es la secuencia de nucleótidos genómica de la *PSMT3*;

60 la figura 4a es la secuencia de aminoácidos deducida de la *PSMT1*; la figura 4b es la secuencia de aminoácidos deducida de la *PSMT2*; la figura 4c es la secuencia de aminoácidos deducida de la *PSMT3*;

la figura 5: amplificación por PCR de *PsSOMT1* del ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas de *Papaver somniferum* GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1, GSK TEBAIÑA CVS1;

- 5 la figura 6a es una representación tabular de la segregación del gen de *PSMT1* en una población de mapeo F2 derivada de un cruce parental de variedades cultivadas de GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBAIÑA CVS1 junto con la co-segregación del gen de *PSMT1* y la acumulación de noscapina en plantas F2 individuales; la figura 6b es la representación tabular equivalente de la segregación del gen de *PSMT2*. El ensayo de genotipado de la *PSMT2* falló (como lo indica la falla al amplificar el control positivo interno) en seis muestras de ADN de plantas F2 que resultaron
10 positivas para la *PSMT1* y la *PSMT3* (indicado con asteriscos); la figura 6c es la representación tabular equivalente de la segregación del gen de *PSMT3*;

la figura 7 ilustra un cromatograma UPLC típico para la solución estándar;

- 15 la figura 8 ilustra un cromatograma UPLC típico para una variedad de amapola que contiene noscapina;

la figura 9: Expresión del gen de metiltransferasa de la *P. somniferum* (*PSMT2*). Las 16 bibliotecas de etiquetas de secuencias expresadas (EST) se generaron por pirosecuenciación usando bibliotecas de ADNc preparadas a partir de tallos (S) y cápsulas (C) en dos etapas de desarrollo de "cosecha temprana" (EH, 1 a 3 días después de la caída
20 de los pétalos) y "cosecha tardía" (LH, 4 a 6 días después de que los pétalos se hayan caído) de cada una de las cuatro variedades cultivadas de *P. somniferum*: GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1, GSK TEBAIÑA CVS1;

la figura 10 muestra los resultados de la amplificación por PCR de *PSMT2* del ADN genómico de las cuatro variedades
25 cultivadas de *Papaver somniferum* GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1, GSK TEBAIÑA CVS1;

figura 11: expresión del gen de metiltransferasa de la *P. somniferum* (*PSMT3*). Las 16 bibliotecas de etiquetas de secuencias expresadas (EST) se generaron por pirosecuenciación usando bibliotecas de ADNc preparadas a partir
30 de tallos (S) y cápsulas (C) en dos etapas de desarrollo de "cosecha temprana" (EH, 1 a 3 días después de la caída de los pétalos) y "cosecha tardía" (LH, 4 a 6 días después de que los pétalos se hayan caído) de cada una de las cuatro variedades cultivadas de *P. somniferum*: GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1, GSK TEBAIÑA CVS1;

35 la figura 12 muestra los resultados de la amplificación por PCR de *PSMT3* del ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas de *Papaver somniferum* GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1, GSK TEBAIÑA CVS1;

La figura 13 es la parte larga de 622 bases de la secuencia del gen de *FITOENO DESATURASA* amplificada del ADNc
40 de GSK NOSCAPINA CVS1. El tramo de secuencia larga de 129 bases usado para silenciar el gen de *FITOENO DESATURASA* está subrayado;

la figura 14 es la parte de la secuencia de ADNc usada para silenciar la *PSMT1*;

45 la figura 15 es la parte de la secuencia de ADNc usada para silenciar la *PSMT2*;

la figura 16 muestra el área de pico normalizada de scoulerina en los cromatogramas UPLC obtenidos de látex y cápsulas maduras de plantas que muestran el fenotipo de foto-blanqueo después de la infección con las
50 construcciones silenciadoras pTRV2-PDS-PSMT1, pTRV2-PDS-PSMT2 o pTRV2-PDS, respectivamente. También se muestra el área del pico de scoulerina obtenida de plantas no infectadas. Se analizaron entre 21 y 30 plantas por construcción; y

la figura 17 muestra el área de pico normalizada de narcotolina putativa en los cromatogramas UPLC obtenidos de látex y cápsulas maduras de plantas que muestran el fenotipo de foto-blanqueo después de la infección con las
55 construcciones silenciadoras pTRV2-PDS-PSMT1, pTRV2-PDS-PSMT2 o pTRV2-PDS, respectivamente. También se muestra el área del pico de narcotolina putativa obtenida de plantas no infectadas. Se analizaron entre 21 y 30 plantas por construcción.

Materiales y procedimientos

60

Generación de bibliotecas de EST

a) Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

- 5 El material se cosechó de tallos y cápsulas en dos etapas de desarrollo de cuatro variedades cultivadas de amapola. El ARN se preparó individualmente a partir de cinco plantas por variedad cultivada, etapa de desarrollo y órgano. El material cosechado se molió en nitrógeno líquido usando un mortero y una mano de mortero. El ARN se aisló de las preparaciones de tallo o cápsula molidas usando un procedimiento basado en CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) como se describe en Chang y col. (1993) *Planta Mol. Biol. Reps.* 11: 113-116 con ligeras
- 10 modificaciones (tres extracciones con cloroformo: alcohol isoamílico, precipitación de ARN con cloruro de litio a -20 °C durante la noche). El ARN se cuantificó espectrofotométricamente antes de agrupar cantidades iguales de ARN de cinco plantas por variedad cultivada, etapa y órgano. Las muestras agrupadas se sometieron a una etapa de purificación final usando un MicroKit RNeasy Plus (Qiagen, Crawley, Reino Unido) para eliminar el ADN genómico restante de las preparaciones. El ARN se eluyó típicamente en 30-100 µl de agua. El ADNc se preparó usando un kit
- 15 de construcción de biblioteca de ADNc SMART (Clontech, Saint-Germainen-Laye, Francia) según las instrucciones del fabricante, pero usando la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) para la síntesis de la primera cadena. El cebador de PCR CDSIII se modificó para: 5'ATT CTA GAT CCR ACA TGT TTT TTT TTT TTT TTT TVN 3' donde R = A o G, V = A, C o G; N = A/T o C/G. El ADNc se digirió con Mmel (New England Biolabs Inc., Hitchin, Reino Unido) seguido de una purificación final usando un kit de purificación por PCR QIAquick
- 20 (Qiagen, Crawley, Reino Unido).

b) prosecuenciación de ADNc

- La plataforma de secuenciación Roche 454 GS-FLX (Branford, CT, EE. UU.) se usó para realizar la pirosecuenciación
- 25 en muestras de ADNc preparadas a partir de los siguientes materiales para cada una de las cuatro variedades cultivadas de *P. somniferum* GSK MORFINA CVS2, GSK MORHINE CVS1, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBAINA CVS1:

1. Tallo, 1 a 3 días después de la caída del pétalo (cosecha temprana)
- 30 2. Tallo, 4 a 6 días después de la caída del pétalo (cosecha tardía)
3. Cápsula, 1 a 3 días después de la caída del pétalo (cosecha temprana)
4. Cápsula, 4 a 6 días después de la caída del pétalo (cosecha tardía)

c) Análisis de secuencia sin procesar, ensamblaje de secuencia contigua y anotación

- 35 Los conjuntos de datos de secuencia sin procesar se derivaron de la secuenciación etiquetada paralela en la plataforma de secuenciación 454 (Meyer y col. (2008) *Nature Protocols* 3: 267-278). Las secuencias de cebador y etiqueta se eliminaron primero de todas las lecturas de secuencia individuales. El ensamblaje de secuencia contigua solo se realizó en secuencias de más de 40 nucleótidos y que contenían menos del 3 % de residuos desconocidos
- 40 (N). Estas secuencias de EST de alta calidad se ensamblaron en secuencias contiguas únicas con el Programa de ensamblaje de secuencias CAP3 (Huang y Madan (1999) *Genome Res.* 9: 868-877), y los contigs resultantes se anotaron localmente usando el programa BLAST2 (Altschul y col. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402) contra la base de datos de péptidos no redundantes descargada del NCBI.

45 d) Perfilado de la expresión de los genes de metiltransferasa

El número de EST asociadas con las respectivas secuencias consenso de metiltransferasa se contaron en cada una de las 16 bibliotecas de EST. Los valores obtenidos se normalizaron sobre la base de las EST totales obtenidas por biblioteca.

50

RT-PCR en el ARNm de GSK NOSCAPINA CVS1, amplificación directa y secuenciación de ADNc de longitud completa de la *PSMT1*.

- Se usó una alícuota de ADNc de GSK NOSCAPINA CVS1 preparado para la pirosecuenciación de ADNc (véase
- 55 arriba) para amplificar y secuenciar la secuencia de codificación de longitud completa de la *PSMT1*, usando las siguientes condiciones de PCR: Mezcla de reacción:

5 x tampón HF (Finnzymes)	5 µl
dNTP (20 mM cada una)	0,25 µl
Cebador directo (10 µM)	2,5 µl
Cebador inverso (10 µM)	2,5 µl

(continuación)

ADNg (10 ng/μl)	5 μl
Phusion Hot Start (Finnzymes)	0,25 μl
dH ₂ O	9,5 μl

Volumen de reacción: 25 μl

El Phusion Hot Start de Finnzymes fue comprado a través de New England Biolabs, (Bishops Stortford, Reino Unido).

5

Programas de PCR:

30 ciclos de:	desnaturalización inicial	98 °C	1 min
	desnaturalización	98 °C	30 segundos
	temperatura de hibridación	61 °C	30 segundos
	extensión	72 °C	40 segundos
combinación de cebadores:	extensión final	72 °C	10 min
	incubación	4 °C	almacenamiento
	PSMT1_CLF: ATAGGATCCAACATGGCTACCAATGGCG		
	PSMT1_CLR: GCGCTCGAGCATTTCATTTGTGA		

10 Estos cebadores cumplieron un doble propósito, ya que se usaron para amplificar el ADNc de la *PSMT1* para la secuenciación y la clonación (la clonación no se describe aquí). Las bases subrayadas de los cebadores de clonación delinean los nucleótidos que son específicos de secuencia para el extremo 5' y 3' del ADNc de la *PSMT1*, respectivamente. La secuencia de nucleótidos específica de la *PSMT1* usada para diseñar los cebadores se confirmó al secuenciar el gen de *PSMT1* del ADN genómico como se describe a continuación.

15 Los productos de PCR se limpiaron con el kit de purificación de PCR Agencourt AMPure (Beckman Coulter, High Wycombe, Reino Unido) y se secuenciaron mediante secuenciación de Sanger.

Amplificación y secuenciación de los genes de metiltransferasa del ADN genómico

20 a) Preparación de ADN genómico

Se recogieron muestras de hojas (30-50 mg) para la extracción de ADN de plantas de GSK MORHINE CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBAIÑA CVS1 cultivadas en el invernadero. El ADN se extrajo usando Qiagen BioSprint 96. El ADN extraído se cuantificó usando Hoescht 33258 y se normalizó a 10 ng/μl.

25

b) Amplificación y secuenciación de los genes de metiltransferasa del ADN genómico de GSK NOSCAPINA CVS1

30 Los cebadores y las secuencias de cebadores usados para la amplificación de los respectivos genes de metiltransferasa del ADN genómico extraído se muestran en la tabla 1. Los cebadores se diseñaron en base a los respectivos contigs de metiltransferasa ensamblados de las EST únicas para la variedad cultivada GSK NOSCAPINA CVS1. Los contigs respectivos contenían el marco de lectura abierto completo de cada metiltransferasa, así como las regiones no traducidas 5' y 3'. La amplificación del ADN genómico se realizó usando las combinaciones de cebadores que se muestran en la tabla 2 y las condiciones de PCR que se muestran a continuación. Las amplificaciones por PCR se realizaron en grupos de ADN genómico que comprendían ADN de cuatro individuos. Se resolvieron 5 μl de cada

35 reacción de PCR en agarosa al 1,2 % junto con los estándares de tamaño apropiados.

Mezcla de reacción:

5 x tampón HF (Finnzymes)	5 μl
dNTP (20 mM cada una)	0,25 μl
Cebador directo (10 μM)	2,5 μl
Cebador inverso (10 μM)	2,5 μl
ADNg (10 ng/μl)	5 μl
Phusion Hot Start (Finnzymes)	0,25 μl
dH ₂ O	9,5 μl

40 Volumen de reacción: 25 μl

Programa de PCR:

La temperatura de hibridación y el tiempo de extensión para las combinaciones de cebador respectivas se muestran en las tablas 2 y 3.

30 ciclos de:	desnaturalización inicial	98 °C	1 min
	desnaturalización	98 °C	30 segundos
	temperatura de hibridación	Tabla 2 y 3	30 segundos
	extensión	72 °C	Tabla 2 y 3
	extensión final	72 °C	10 min
	incubación	4 °C	almacenamiento

Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación Agencourt AMPure (BECKMAN COULTER UK LTD, Bromley, Reino Unido). 30-50 ng del producto de PCR purificado respectivo se sometieron a secuenciación Sanger usando los cebadores indicados en la tabla 2 como cebadores de secuenciación.

Las secuencias de aminoácidos de la metiltransferasa respectiva, deducidas de las secuencias del marco de lectura abierto confirmadas por la secuenciación de Sanger, se compararon con las secuencias de proteínas depositadas en la base de datos de proteínas redundantes NCBI no 15 usando el programa Standard Protein BLAST (blastp).

c) Análisis de ADN genómico de GSK NOSCAPINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK MORHINE CVS1 y GSK TEBAÍNA CVS1 en búsqueda de la presencia de los genes de metiltransferasa

Para verificar si los respectivos genes de metiltransferasa estaban presentes en las cuatro variedades cultivadas, se realizaron ampliaciones por PCR en ADN genómico de GSK NOSCAPINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK MORHINE CVS1 y GSK TEBAÍNA CVS1, usando las combinaciones de cebadores que se muestran en la tabla 3. Para amplificar las secuencias genómicas de longitud completa de GSK NOSCAPINA CVS1, se usaron exactamente las mismas condiciones de PCR descritas anteriormente. El ADN genómico se obtuvo de cuatro plantas individuales por variedad cultivada. Se resolvieron 5 µl de cada reacción de PCR en agarosa al 1 % junto con los estándares de tamaño apropiados.

Análisis de ADN genómico y perfiles de alcaloides de la paja de amapola de una población F2

a) Extracción de ADN de plantas F2

Se cosecharon 40-50 mg de tejido foliar, por duplicado, de todas las plantas de amapola dentro de la población de mapeo GSK NOSCAPINA CVS1 X GSK TEBAÍNA CVS1 F2 en la etapa de crecimiento de 'roseta pequeña' (~10 hojas presentes en cada planta).

Se recogió tejido foliar (40 - 50 mg de peso húmedo) en tubos de muestra de 1,2 ml en formato de 8 x 12 (Número de pieza 1760-00, Scientific Specialties Inc, 130 Thurman St, Lodi, CA 95240 EE. UU.), se lo cerró con tapas de tira (Parte Número 1702-00, Scientific Specialties Inc.) y se lo envió al AGRF (Centro Australiano de Investigación del Genoma), en Adelaida, en paquetes de hielo seco Techni-Ice por mensajería con entrega al día siguiente.

En el recibo, se retiraron las tapas de tiras y se añadió una perla de carburo de tungsteno de 3 mm a cada tubo (Número de pieza 69997, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Las muestras se colocaron a -80 °C (modelo de congelador; Sanyo MDF-U73V) durante un mínimo de dos horas antes de la liofilización durante 18 h (Christ Model Alpha 2-4 LSC).

Después de la liofilización, los tubos se sellaron con tapas de tiras nuevas (como se indicó anteriormente) y las muestras se pulverizaron mediante molienda de perlas (Modelo "Tissue Lyser", número de pieza 85300; Qiagen) a 3.000 RPM durante 2 ciclos de 60 segundos separados por inversión de placa. La extracción de ADN se realizó usando el sistema "Nucleospin Plant II" (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG Neumann-Neander-Straße 6-8, 52355 Düren, Alemania).

La lisis celular se realizó usando el conjunto de tampones PL2/3 suministrado. Se siguió el protocolo del fabricante para la extracción centrífuga (modelo de centrifugadora 4-K 15; Sigma Laborzentrifugen GmbH, 37520 Osterode am Harz, Alemania).

(continuación)

Se comprobó la calidad y cantidad del ADN recuperado (12/96 muestras, una muestra por columna de placa) mediante espectroscopía ultravioleta (modelo Nanodrop-8000; productos NanoDrop, 3411 Silverside Rd, Bancroft Building; Wilmington, DE 19810, EE.UU.) A 230, 260 y 280 nM.

5

b) Genotipado de muestras de ADN F2 en búsqueda de la presencia o la ausencia de las metiltransferasas

Se genotiparon las muestras de ADN de un total de 276 plantas F2 en búsqueda de la presencia o ausencia de la *PSMT1*, la *PSMT2* y la *PSMT3*, respectivamente, amplificando un fragmento corto de cada uno de los genes. Se usaron cebadores directos marcados con 5'-VIC para la amplificación de cada uno de los fragmentos de metiltransferasa, permitiendo la separación y el análisis de los fragmentos de PCR marcados con fluorescencia resultantes en el sistema analizador de ADN 3730xl de 96 capilares (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante. Además de los respectivos fragmentos de metiltransferasa, se amplificó un control positivo interno en cada ensayo de PCR para distinguir la falta de amplificación debido a la ausencia de los genes de metiltransferasa reactivos en una muestra de ADN de la falta de amplificación debido a la falla del ensayo de PCR.

Se usaron los siguientes cebadores (las secuencias de cebadores se muestran en la tabla 1):

PSMT1: PSMT1_F3/PSMT1_R1; tamaño de fragmento amplificado: 129 bp
 20 *PSMT2*: PSMT2_F4/PSMT2_R3; tamaño de fragmento amplificado: 284bp
PSMT3: PSMT3_F4/PSMT3_R2; tamaño de fragmento amplificado: 309 bp

Los fragmentos de *PSMT1* y *PSMT3* se amplificaron con las siguientes condiciones de PCR: Mezcla de reacción:

5 x tampón GoTaq (Promega)	2 µl
dNTP (2,5 mM cada una)	0,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,6 µl
Cebador directo (10 µM)	0,5 µl
Cebador inverso (10 µM)	0,5 µl
ADNg (5 ng/µl)	2 µl
GoTaq (Promega)	0,2 µl
dH ₂ O	3,7 µl

25 Volumen de reacción: 10 µl

Programa de PCR:

30 ciclos de:	desnaturalización inicial	94 °C	1 min
	desnaturalización	94 °C	30 segundos
	temperatura de hibridación	62 °C	30 segundos
	extensión	72 °C	20-30 segundos
	extensión final	72 °C	5 min
	incubación	4 °C	almacenamiento

El fragmento de *PSMT2* se amplificó con las siguientes condiciones de PCR: Mezcla de reacción:

5 x mezcla de PCR Type-it múltiple (Qiagen)	5 µl
Cebador directo (10 µM)	0,5 µl
Cebador inverso (10 µM)	0,5 µl
ADNg (5 ng/µl)	2 µl
dH ₂ O	2 µl

30

Volumen de reacción: 10 µl

Programa de PCR:

30 ciclos de:	desnaturalización inicial	95 °C	15 min
	desnaturalización	95 °C	15 segundos
	temperatura de hibridación	60 °C	30 segundos
	extensión	72 °C	30 segundos
	extensión final	72 °C	5 min
	incubación	4 °C	almacenamiento

35 c) Análisis de paja de amapola de plantas F2

Las cápsulas de amapola se cosecharon a mano de la población de mapeo una vez que las cápsulas se habían secado hasta aproximadamente un 10 % de humedad en la planta. La semilla se separó manualmente de la cápsula, y el material de paja de la cápsula (paja de amapola) se envió a la instalación de extracción GSK en Port Fairy, Australia.

5

Las muestras de paja de amapola se molieron en un molino de bolas Retsch Modelo MM04 hasta obtener un polvo fino. Después se pesaron con precisión dos gramos de muestras de paja de amapola molida ($2 \pm 0,003$ g) y se extrajeron en 50 ml de una solución de ácido acético al 10 %. La suspensión de extracción se agitó en un agitador orbital a 200 rpm durante un mínimo de 10 minutos y después se filtró para proporcionar un filtrado transparente. El filtrado final se pasó a través de un filtro de 0,22 μ m antes del análisis.

10

Las soluciones se analizaron usando un sistema Waters Acquity UPLC equipado con una columna Waters Acquity BEH C18, de 2,1 mm x 100 mm, con un empaque de 1,7 micrones. La fase móvil usó un perfil de gradiente con eluyente A que consiste en ácido tetrafluoroacético al 0,1 % en agua desionizada y eluyente B que consiste en acetonitrilo al 100 %. Las condiciones de gradiente de fase móvil usadas son las que se enumeran en la tabla 2, el número de curva de gradiente se determina usando un paquete de software de cromatografía Waters Empower. El caudal fue de 0,6 ml por minuto y la columna se mantuvo a 45 °C. El volumen de inyección fue de 1 μ l de volumen de inyección y los alcaloides se detectaron usando un detector UV a 285 nm.

15

20 La pérdida por secado (LOD) de la paja se determinó mediante secado en un horno a 105 grados centígrados durante 3 horas.

- Programa de flujo de gradiente:

TIEMPO (minutos)	% de eluyente A	% de eluyente B	Flujo (ml/min)	Curva No.
0,00	95,0	5,0	0,60	INICIAL
0,80	90,0	10,0	0,60	6
3,40	75,0	25,0	0,60	3
3,60	95,0	5,0	0,60	6
4,00	95,0	5,0	0,60	11

25

Las concentraciones de alcaloides para la morfina, la codeína, la tebaína, la oripavina y la noscapina se determinaron mediante comparación con soluciones estándar y los resultados se calcularon en base al peso seco.

Los tiempos de retención típicos son los siguientes:

30

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Morfina	1,14
Pseudo morfina	1,26
Codeína	1,69
Oripavina	1,80
10-hidroxitebaína	2,32
Tebaína	2,53
Noscapina	3,16

Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) de la *PSMT1* y la *PSMT2*

a) Generación de construcciones silenciadoras

35

Un sistema de silenciamiento génico inducido por virus basado en el virus del cascabel del tabaco (TRV) desarrollado y descrito por Liu y col. (2002) Plant J. 30 (4): 415-429 se usó para investigar la función genética de la *PSMT1* y la *PSMT2*. Los fragmentos de ADN seleccionados para silenciar la *PSMT1* y la *PSMT2* respectivamente, se amplificaron por PCR y se clonaron en el vector de silenciamiento pTRV2 (No. de acceso a GenBank AF406991; Liu y col. (2002) Plant J. 30 (4): 415-429). Estaban vinculados a un fragmento de 129 pb de largo del gen de *P. somniferum Phytoene desaturase (PsPDS)* para silenciar las respectivas metiltransferasas y el *PsPDS* simultáneamente. Plantas que muestran el fenotipo de foto-blanqueo que resultó del silenciamiento de *PsPDS* (Hileman y col. (2005) Plant J. 44 (2): 334-341) se identificaron como plantas infectadas con éxito con las construcciones de silenciamiento respectivas y seleccionadas para el análisis.

45

- Generación de la construcción pTRV2-PDS: Un fragmento de 622 pb (figura 13) de *PsPDS* se amplificó a partir de ADNc preparado a partir de GSK NOSCAPINA CVS1, como se describió anteriormente, usando los cebadores ps_pds_F y ps_pds_R4 (tabla 4). La secuencia del cebador directo se basó en un contig de 412 pb de largo derivado de las bibliotecas EST que compartían el 99 % de identidad en su extremo 3' con la secuencia de codificación parcial del *P. somniferum fitoeno desaturasa* (No. de acceso a GenBank DQ116056). La secuencia del cebador inverso se diseñó en base a la secuencia DQ116056. Las condiciones de PCR fueron idénticas a las descritas anteriormente para la amplificación de la *PSMT1* de la secuencia genómica, excepto que la etapa de hibridación se llevó a cabo a 70 °C y el tiempo de extensión se incrementó a 60 segundos.
- 10 La digestión con Sau3AI del fragmento de PCR produjo, entre otros, dos fragmentos (280 pb y 129 pb de longitud) que portaban extremos adhesivos compatibles con BamHI en ambos extremos, 5' y 3'. El fragmento de 129 pb de longitud (tramo subrayado en la figura 13) se clonó en el sitio BamHI del vector pTRV2. Debido a que Sau3AI se usó para producir extremos adhesivos compatibles con BamHI, el sitio BamHI en el extremo 5 del inserto PDS se abolió en la construcción pYL156-PDS. Sin embargo, el sitio de reconocimiento de BamHI en su extremo 3' se mantuvo intacto debido a la naturaleza de la secuencia de inserción de PDS.

Una construcción de pTRV2-PDS confirmada por secuencia, con el fragmento de 129 pb en orientación de sentido, se usó posteriormente como un vector para generar las construcciones de silenciamiento de la *PSMT1* y la *PSMT2*, y sirvió como control en los experimentos VIGS.

- 20 Generación de construcciones silenciadoras para *PS PSMT1* y *PSMT2* (pTRV2-PDS-PSMT1 y pTRV2-PDS-PSMT2): Los fragmentos de ADN seleccionados para silenciar *PSSOMT1* y *el PSSOMT2* se amplificaron a partir de ADNc de GSK NOSCAPINA CVS1, preparado como se describió anteriormente, con el uso de las secuencias de cebadores que se muestran en la tabla 5. Sitios de restricción adicionales (cebadores directos: XhoI y HindIII para cebadores directos; se agregaron sitios KpnI para cebadores inversos a los cebadores específicos de genes para facilitar la clonación. Las condiciones de amplificación fueron las descritas anteriormente para amplificar el fragmento de *PDS* fragmento, excepto que las temperaturas de hibridación fueron 60,9 °C para la *PSMT1* y 62,8 °C para la *PSMT2* y el tiempo de extensión fue de 30 segundos.

- 30 La secuencia seleccionada para silenciar la *PSMT1* (figura 14) se clonó en pTV00 (Ratcliff y col. (2001) Plant J. 25 (2): 237-245) usando HindIII y KpnI y se subclonó en pTRV2-PDS usando BamHI y KpnI. En los experimentos VIGS, se usó una construcción pTRV2-PDS-PSMT1 confirmada por secuencia.

La secuencia seleccionada para silenciar la *PSMT2* (figura 15) se clonó directamente en pTRV2-PDS. Como la amplificación por PCR se realizó con Phusion (Finnzymes, Finlandia), el fragmento de PCR resultante tenía extremos romos y, después de cortar con XhoI, se lo clonó en pYL156-PDS cortado con XhoI y SmaI. En los experimentos VIGS, se usó una construcción pTRV2-PDS-PSMT2 confirmada por secuencia.

40 b) Transformación de construcciones en *Agrobacterium tumefaciens*

La propagación de las construcciones de silenciamiento se realizó con la cepa de *E. coli* DH5 α y, posteriormente, las construcciones de silenciamiento respectivas, así como pTRV1 (No. de acceso a GenBank AF406990; Liu y col. (2002) Plant J. 30 (4): 415-429) se transformaron independientemente en *Agrobacterium tumefaciens* electrocompetentes (cepa GV3101).

45 c) Infiltración de plantas

Durante la noche, se usaron cultivos líquidos de *A. tumefaciens*, que contenían cada construcción de silenciamiento, para inocular un medio Luria-Bertani (LB) que contenía MES 10 mM, acetosiringona 20 μ M y kanamicina 50 μ g/ml. Los cultivos se mantuvieron a 28 °C durante 24 horas, se cosecharon por centrifugación a 3000 g durante 20 min, y se volvieron a suspender en la solución de infiltración (MES 10 mM, acetosiringona 200 μ M, MgCl₂ 10 mM) a un OD₆₀₀ de 2,5. Los *A. tumefaciens* que albergan las construcciones respectivas (pTRV2-PDS-PSMT1, pTRV2-PDS-PSMT2 o, como control, pTRV2-PDS) se mezclaron en 1:1 (v/v) con *A. tumefaciens* que contienen pTRV1, y se incubaron durante dos horas a 22 °C antes de la infiltración. Se infiltraron plántulas de dos semanas de edad de GSK NOSCAPINA CVS1 cultivadas en condiciones estándar de invernadero (22 °C, 16 h de fotoperíodo), con primeras hojas emergentes, como lo describen Hagel y Facchini (2010) Nat. Chem Biol., 6: 273-275.

d) Análisis de látex y cápsulas de plantas silenciadas

60 El látex de las hojas de las plantas de amapola infiltradas que muestran foto-blanqueo como un marcador visual para

una infección y un silenciamiento exitosos se analizaron cuando aparecieron los primeros botones florales (plantas de ~7 semanas de edad). Para el análisis, se seleccionaron las plantas que muestran un grado similar de foto-blanqueo de las hojas.

- 5 Se recogió el látex de los pecíolos cortados, con una sola gota dispersada en 500 μ l de ácido acético al 10 %. Esto se diluyó 10x en ácido acético al 1 % para obtener una solución alcaloide en ácido acético al 2 % para su posterior análisis. Las cápsulas se cosecharon a mano del invernadero cultivado de las mismas plantas usadas para el análisis de látex y las cápsulas individuales se molieron en un molino de bolas Retsch Modelo MM04 hasta obtener un polvo fino. Después se pesaron con precisión 10 mg de muestras de paja de amapola molida ($10 \pm 0,1$ mg) y se extrajeron en 0,5 mL de una solución de ácido acético al 10 % con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se clarificaron por centrifugación y una submuestra de 50 μ L se diluyó 10x en ácido acético al 1 % para obtener una solución de alcaloide en ácido acético al 2 % para su posterior análisis.

- Todas las soluciones se analizaron usando un sistema Waters Acquity UPLC equipado con una columna Waters Acquity BEH C18, de 2,1 mm x 100 mm, con un empaque de 1,7 micrones. La fase móvil usó un perfil de gradiente con eluyente A que consistía en bicarbonato de amonio 10 mM, pH 10,2 y eluyente B metanol. Las condiciones de gradiente de fase móvil usadas son las que se enumeran en la tabla 1, con un gradiente lineal. El caudal fue de 0,5 ml por minuto y la columna se mantuvo a 60 °C. El volumen de inyección fue de 2 μ L y los picos eluidos se ionizaron en modo APCI positivo y se detectaron dentro de una precisión de masa de ~3 ppm usando un Thermo LTQ-Orbitrap.
- 20 Las ejecuciones se controlaron mediante el software Thermo Xcalibur.

- Programa de flujo de gradiente:

TIEMPO (minutos)	% de eluyente A	% de eluyente B	Flujo (ml/min)
0,0	98,0	2,0	0,50
0,2	98,0	2,0	0,50
0,5	60,0	40	0,50
4,0	20,0	80,0	0,50
4,5	20,0	0,0	0,50

- 25 Todos los análisis de datos se llevaron a cabo en R. Los picos alcaloides putativos se cuantificaron por sus áreas de iones pseudomoleculares usando guiones personalizados. Se compilaron listas de picos y se identificaron las diferencias significativas entre picos entre muestras usando ANOVA de 1 vía con valores de p ajustados usando la corrección de Bonferroni para el número de picos únicos en el conjunto de datos. Para cualquier comparación entre picos con valores de p ajustados < 0,05, se usó la prueba HSD de Tukey para identificar picos significativamente diferentes entre cualquier muestra dada y el control. Los alcaloides se identificaron comparando los valores exactos de masa y tiempo de retención con los de los estándares. Cuando los estándares no estaban disponibles, se usaron masas exactas neutras para generar resultados de fórmulas moleculares dentro de restricciones elementales de C = 1:100, H = 1:200, O = 0:200, N = 0:3 y precisión de masa < 20 ppm. El golpe con el error de ppm más bajo dentro de estas restricciones se usó para asignar una fórmula putativa.

35

Ejemplo 1

Ensamble de la secuencia de ADNc de longitud completa para la *PSMT1* de las EST y confirmación por secuenciación de ADNc de longitud completa

40

La secuencia de ADNc de longitud completa para la *PSMT1* (figura 1a) se ensambló de las EST derivadas de la plataforma de secuenciación 454 usando el programa de ensamblaje de secuencias CAP3. La secuencia de ADNc de longitud completa se confirmó por RT-PCR y la amplificación directa del ADNc de longitud completa del ARNm de GSK NOSCAPINA CVS1.

45

Ejemplo 2

La *PSMT1* se expresa exclusivamente en la variedad cultivada de *Papaver somniferum* GSK NOSCAPINA CVS1 que produce noscapina.

50

La figura 2 muestra la distribución normalizada de EST asociadas con la secuencia de consenso de la *PSMT1* en cada una de las 16 bibliotecas de EST preparadas a partir de dos órganos (cápsulas y tallos) en dos etapas de desarrollo (cosecha temprana y tardía) de cada una de las cuatro variedades cultivadas de amapola, GSK MORHINE CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBÁINA CVS1. Las EST correspondientes a *PsSOMT* se

encontraron exclusivamente en bibliotecas derivadas de la variedad cultivada de GSK NOSCAPINA CVS1 que produce noscapina (figura 2). La expresión de la *PSMT1* fue más fuerte en el tejido del tallo poco después de la floración.

5 Ejemplo 3

Amplificación por PCR de la *PSMT1* del ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas de *Papaver somniferum* GSK NOSCAPINA CVS1, GSK MORHINE CVS1, GSK MORFINA CVS2 y GSK TEBAIÑA CVS1.

- 10 Las amplificaciones por PCR de los fragmentos de la *PSMT1* se realizaron en ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas: GSK NOSCAPINA CVS1 (variedad noscapina), GSK MORHINE CVS1 y GSK MORFINA CVS2 (variedades de morfina) y GSK TEBAIÑA CVS1 (variedad tebaína), usando las combinaciones de cebadores que se muestran en las tablas 2 y 3.
- 15 La figura 5 muestra la amplificación por PCR de la *PSMT1* del ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas de *Papaver somniferum* GSK NOSCAPINA CVS1, GSK MORHINE CVS1, GSK MORFINA CVS2 y GSK TEBAIÑA CVS1.

La amplificación del ADN genómico produjo la secuencia del gen que se muestra en la figura 3a.

20 Ejemplo 4

La proteína putativa codificada por la *PSMT1* muestra la mayor similitud de secuencia con las (S)-scoulerina 9-O-metiltransferasas de la *Coptis japonica* y de la *Thalictrum flavum*

- 25 Los homólogos más cercanos a la proteína putativa codificada por el marco de lectura abierto de la *PSMT1* (figura 4) son las (S)-scoulerina 9-O-metiltransferasas de la *Coptis japonica* (número de muestreo: Q39522.1, Evalúe: 1e-120, 61 % idéntico) y de la *Thalictrum flavum* (número de muestreo: AAU20770.1, Evalúe: 5e-118, 59 % idéntico).

Ejemplo 5

- 30 **La *PSMT1* solo está presente en el genoma de la variedad cultivada de *P. somniferum* GSK NOSCAPINA CVS1 que produce noscapina**

- La región transcrita cubierta por las EST contenía la secuencia de codificación completa de la *PSMT1* (incluidas las regiones no traducidas 5' y 3'), que se usó para el diseño del cebador (tabla 1) para amplificar el gen de *PSMT1* del ADN genómico en una serie de fragmentos superpuestos para la secuenciación (figura 3a). Al probar un subconjunto de las combinaciones de cebadores (tabla 3) en muestras de ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas, se descubrió que los fragmentos de la *PSMT1* solo podían amplificarse a partir del ADN genómico de la variedad productora de noscapina GSK NOSCAPINA CVS1, pero no a partir del ADN genómico de las variedades productoras predominantemente de morfina (GSK MORHINE CVS1 y GSK MORFINA CVS2) o tebaína (GSK TEBAIÑA CVS1) (figura 5). Las amplificaciones por PCR se realizaron en grupos de ADN genómico que comprendían ADN de cuatro individuos por variedad cultivada. Este descubrimiento explica por qué la *PSMT1* solo se expresa en la variedad cultivada GSK NOSCAPINA CVS1 y está ausente en el transcriptoma de las otras tres variedades cultivadas.

45 Ejemplo 6

Ensamble de la secuencia de ADNc de longitud completa para la *PSMT2* de las EST y confirmación por secuenciación de ADN genómico

- 50 La secuencia de ADNc de longitud completa para la *PSMT2* (figura 1b) se ensambló de EST derivadas de la plataforma de secuenciación 454, usando el programa de ensamble de secuencia CAP3. La secuencia de ADNc de longitud completa se confirmó por amplificación y secuenciación a partir de ADN genómico.

Ejemplo 7

- 55 **La *PSMT2* se expresa exclusivamente en la variedad cultivada de *Papaver somniferum* GSK NOSCAPINA CVS1 que produce noscapina**

- La figura 9 muestra la distribución normalizada de EST asociadas con la secuencia de consenso de la *PSMT2* en cada una de las 16 bibliotecas EST preparadas a partir de dos órganos (cápsulas y tallos) en dos etapas de desarrollo

(cosecha temprana y tardía) de cada una de las cuatro variedades cultivadas de amapola, GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBÁINA CVS1. Las EST correspondientes a la *PSMT2* se encontraron exclusivamente en bibliotecas derivadas de la variedad productora de noscapina GSK NOSCAPINA CVS1. La expresión de la *PSMT2* fue más fuerte en el tejido del tallo poco después de la floración.

5

Ejemplo 8

Amplificación por PCR de la *PSMT2* del ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas de *Papaver somniferum* GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBÁINA CVS1

10

Las amplificaciones por PCR de la *PSMT2* se realizaron en ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas de amapola GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBÁINA CVS1, usando las combinaciones de cebadores que se muestran en las tablas 2 y 3.

15 La figura 10 muestra la amplificación por PCR de la *PSMT2* del ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas de *Papaver somniferum* GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBÁINA CVS1;

La amplificación del ADN genómico produjo la secuencia del gen que se muestra en la figura 3b.

20

La proteína putativa codificada por la *PSMT2* muestra la mayor similitud de secuencia con las norcoclaurina 6-O-metiltransferasas de la *Coptis japonica*, la *Papaver bracteatum* y la *Papaver somniferum*

25 Los homólogos más cercanos a la proteína putativa codificada por el marco de lectura abierto de la *PSMT2* (figura 1b) son: la (R, S)-norcoclaurina 6-O-metiltransferasa de la *Coptis japonica* (número de muestreo: Q9LEL6, identidades: 146/355 (42 %)), la norcoclaurina 6-O-metiltransferasa putativa de la *Papaver bracteatum* (número de muestreo: ACO90232, identidades: 151/346 (44 %)) y la S-adenosil-L-metionina:norcoclaurina 6-O-metiltransferasa de la *Papaver somniferum* (número de muestreo: AAP45315, identidades = 148/343 (44 %)). Las comparaciones de

30 secuencias se llevaron a cabo usando el algoritmo 'blastp' de NCBI (procedimiento: ajuste de matriz de composición).

Ejemplo 10

La *PSMT2* solo está presente en el genoma de la variedad cultivada de *P. somniferum* GSK NOSCAPINA CVS1 que produce noscapina.

35

La región transcrita cubierta por las EST contenía la secuencia de codificación completa de la *PSMT2* (incluidas las regiones no traducidas 5' y 3'), que se usó para el diseño del cebador (tabla 1) para amplificar el gen de *PSMT2* del ADN genómico en una serie de fragmentos superpuestos para la secuenciación (figura 3b). Al probar un subconjunto de las combinaciones de cebadores en muestras de ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas, se descubrió que los fragmentos de *PsSOMT2* solo podían amplificarse a partir del ADN genómico de la variedad productora de noscapina GSK NOSCAPINA CVS1, pero no a partir del ADN genómico de las variedades productoras predominantemente de morfina (GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA) o tebaína (GSK TEBÁINA CVS1) (figura 10). Las amplificaciones por PCR se realizaron en grupos de ADN genómico que comprendían ADN de cuatro individuos por variedad cultivada, usando las combinaciones de cebadores que se muestran en la tabla 3. Este descubrimiento explica por qué la *PSMT2* solo se expresa en la variedad cultivada GSK NOSCAPINA CVS1 y está ausente en el transcriptoma de las otras tres variedades cultivadas.

45

Ejemplo 11

50

Ensamble de la secuencia de ADNc de longitud completa para la *PSMT3* de las EST y confirmación por secuenciación de ADN genómico

La secuencia de ADNc de longitud completa para la *PSMT3* (figura 1c) se ensambló de EST derivadas de la plataforma de secuenciación 454, usando el programa de ensamble de secuencia CAP3. La secuencia de ADNc de longitud completa se confirmó por amplificación y secuenciación a partir de ADN genómico.

55

Ejemplo 12

60 **La *PSMT3* se expresa exclusivamente en la variedad cultivada de *Papaver somniferum* GSK NOSCAPINA CVS1**

que produce noscapina.

La figura 11 muestra la distribución normalizada de EST asociadas con la secuencia de consenso de la *PSMT3* en cada una de las 16 bibliotecas EST preparadas a partir de dos órganos (cápsulas y tallos) en dos etapas de desarrollo (cosecha temprana y tardía) de cada una de las cuatro variedades cultivadas de amapola, GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBÁINA CVS1. Las EST correspondientes a *PsSOMT3* se encontraron exclusivamente en bibliotecas derivadas de la variedad cultivada de GSK NOSCAPINA CVS1 que produce noscapina (figura 11). La expresión de la *PSMT3* fue más fuerte en el tejido del tallo poco después de la floración.

10 Ejemplo 13**Amplificación por PCR de la *PSMT3* del ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas de *Papaver somniferum* GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBÁINA CVS1**

15 Las amplificaciones por PCR de la *PSMT3* se realizaron en ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas de amapola GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBÁINA CVS1, usando las combinaciones de cebadores que se muestran en las tablas 2 y 3.

La figura 12 muestra la amplificación por PCR de la *PSMT3* del ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas de *Papaver somniferum* GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA CVS2, GSK NOSCAPINA CVS1 y GSK TEBÁINA CVS1;

La amplificación del ADN genómico produjo la secuencia del gen que se muestra en la figura 3c.

Ejemplo 14

25

La proteína putativa codificada por la *PSMT3* muestra la mayor similitud de secuencia con las norcoclorina 6-O-metiltransferasas de la *Papaver somniferum* y la *Papaver bracteatum*

Los homólogos más cercanos a la proteína putativa codificada por el marco de lectura abierto de la *PSMT3* (figura 4) son las (R, S)-norcoclorina 6-O-metiltransferasas de la *Papaver somniferum* (número de muestreo: AAQ01669, identidades: 275/346 (80 %), *Papaver somniferum* (número de muestreo: AAP45315, identidades = 275/346 (80 %) y *Papaver bracteatum* (número de muestreo: ACO90232, identidades: 274/346 (80 %)). Las comparaciones de secuencias se llevaron a cabo usando el algoritmo 'blastp' de NCBI (procedimiento: ajuste de matriz de composición).

35 Ejemplo 15**La *PSMT3* solo está presente en el genoma de la variedad cultivada de *P. somniferum* GSK NOSCAPINA CVS1 que produce noscapina.**

40 La región transcrita cubierta por las EST contenía la secuencia de codificación completa de la *PSMT3* (incluidas las regiones no traducidas 5' y 3'), que se usó para el diseño del cebador (tabla 1) para amplificar el gen de la *PSMT3* del ADN genómico en una serie de fragmentos superpuestos para la secuenciación (figura 3c). Al probar un subconjunto de las combinaciones de cebadores en muestras de ADN genómico de las cuatro variedades cultivadas, se descubrió que los fragmentos de la *PSMT3* solo podían amplificarse a partir del ADN genómico de la variedad productora de noscapina GSK NOSCAPINA CVS1, pero no a partir del ADN genómico de las variedades productoras predominantemente de morfina (GSK MORFINA CVS1, GSK MORFINA) o tebaína (GSK TEBÁINA CVS1) (figura 12). Las amplificaciones por PCR se realizaron en grupos de ADN genómico que comprendían ADN de cuatro individuos por variedad cultivada, usando las combinaciones de cebadores que se muestran en la tabla 3. Este descubrimiento explica por qué la *PSMT3* solo se expresa en la variedad cultivada GSK NOSCAPINA CVS1 y está ausente en el transcriptoma de las otras tres variedades cultivadas.

Ejemplo 16

La scoulerina y la narcotolina putativa se acumulan en las plantas de *PSMT1* y *PSMT2* silenciadas, respectivamente. El silenciamiento génico inducido por virus condujo a la acumulación de scoulerina tanto en cápsulas de látex como en cápsulas maduras de plantas de *PSMT1* silenciada, pero no de plantas de *PSMT2* silenciada, plantas de control de PDS silenciado o plantas no infectadas de GSK NOSCAPINA CVS1 (figura 16). La scoulerina ha demostrado ser un intermediario en la biosíntesis de noscapina (Battersby y col. (1968) J. Chem. Soc. (C): 2163-2172).

60 La narcotolina putativa (4-desmetil-noscapina) se acumuló en el látex y las cápsulas de plantas de *PSMT2* silenciada

pero no de plantas de PSMT1 silenciada, plantas de control de PDS silenciada o plantas no infectadas de GSK NOSCAPINA CVS1 (figura 17).

Ejemplo 17

5

Tanto la PSMT1, como la PSMT2 y la PSMT3 están vinculadas e involucradas en la biosíntesis de noscapina. Los tres genes de la metiltransferasa están presentes en todas las plantas F2 que contienen noscapina. Todas las plantas F2 que no contienen los genes de la metiltransferasa no producen noscapina (figura 6a-c).

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado seleccionado de entre el grupo que consiste en:
- 5 i) un polipéptido de metiltransferasa que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se representa en la figura 4a, 4b o 4c; o
 ii) un polipéptido modificado que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa en la figura 4a que ha retenido la actividad de metiltransferasa; o
 10 iii) un polipéptido modificado que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa en la figura 4b que ha retenido la actividad de metiltransferasa; o
 iv) un polipéptido modificado que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa en la figura 4c que ha retenido la actividad de
 15 metiltransferasa.
2. El polipéptido aislado según la reivindicación 1, donde dicho polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos en las figuras 4a, 4b o 4c.
- 20 3. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de metiltransferasa donde dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- i) una secuencia de nucleótidos representada por la secuencia en la figura 1a, 1b, 1c, 3a, 3b o 3c; o
 25 ii) una secuencia de nucleótidos donde dicha secuencia está degenerada como resultado del código genético de la secuencia de nucleótidos definida en el inciso (i) anterior;
 iii) una molécula de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con secuencias con al menos un 90 % de identidad con las secuencias representadas en la figura 1a o 3a donde dicha molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido de metiltransferasa; o
 30 iv) una molécula de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con secuencias con al menos un 90 % de identidad con las secuencias representadas en la figura 1b, o 3b, donde dicha molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido de metiltransferasa; o
 v) una molécula de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con secuencias con al menos un 90 % de identidad con las secuencias representadas en la figura 1c o 3c, donde dicha molécula de ácido nucleico codifica un
 35 polipéptido de metiltransferasa.
4. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una metiltransferasa según la reivindicación 2, donde dicha molécula de ácido nucleico está operativamente unida con una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora donde dicha secuencia promotora confiere expresión constitutiva,
 40 regulada, de desarrollo o inducible en dicha metiltransferasa.
5. Una célula vegetal transgénica transformada o transfectada con un vector según la reivindicación 4, donde dicho vector está adaptado para la expresión de una metiltransferasa según la reivindicación 3.
- 45 6. La célula transgénica según la reivindicación 5, donde dicha célula es una célula vegetal donde la célula vegetal es opcionalmente de la familia *Papaveraceae*.
7. Una planta que comprende una célula vegetal según la reivindicación 6, donde dicha planta es opcionalmente de la familia *Papaveraceae*.
- 50 8. Una célula microbiana transgénica transformada o transfectada con un vector según la reivindicación 4, donde dicho vector está adaptado para la expresión de una metiltransferasa según la reivindicación 3.
9. Una molécula de ácido nucleico que comprende un aislada que comprende un casete de transcripción
 55 seleccionado de entre el grupo que consiste en:
- i) un casete que incluye una secuencia de nucleótidos diseñada con referencia a la figura 1a, 1b, 1c, 3a, 3b o 3c y está adaptada para la expresión mediante la provisión de al menos un promotor unido operativamente a dicha secuencia de nucleótidos de modo que tanto las moléculas sentido como antisentido se transcriben desde dicho casete;
 60 ii) el casete según el inciso i) anterior que está adaptado de manera tal que las moléculas de ácido nucleico sentido y

antisentido se transcriben desde dicho casete donde dichas moléculas de ácido nucleico sentido y antisentido están adaptadas para hibridar al menos parte o la totalidad de su longitud para formar un ARNip o ARNhc;

iii) el casete según el inciso i) anterior que está provisto de al menos dos promotores adaptados para transcribir cadenas sentido y antisentido de dicha molécula de ácido nucleico;

5 iv) el casete según los incisos i), ii) o iii) anteriores, que comprende una molécula de ácido nucleico donde dicha molécula comprende una primera parte unida a una segunda parte donde dichas primera y segunda partes son complementarias de al menos parte de su secuencia y además donde la transcripción de dicha molécula de ácido nucleico produce una molécula de ARN que forma una región bicatenaria por apareamiento de bases complementarias de dichas primera y segunda partes, formando así un ARNhc.

10 v) una molécula de ácido nucleico que comprende un casete según cualquiera de los incisos i) a iv), donde dicho casete es parte de un vector adaptado para la expresión en una célula vegetal.

10. La célula vegetal transfectada con una molécula o vector de ácido nucleico según la reivindicación 9(v), donde dicha célula tiene una expresión reducida de dicha metiltransferasa.

15

11. Un procedimiento para la metilación de un alcaloide opiáceo que comprende:

i) proporcionar una célula vegetal transgénica según la reivindicación 6;

ii) cultivar dicha célula vegetal para producir una planta transgénica; y opcionalmente

20 iii) cosechar dicha planta transgénica, o parte de la misma, donde opcionalmente dicho material vegetal cosechado es paja seca y se extrae dicho alcaloide opiáceo.

12. Un procedimiento para la metilación de un alcaloide opiáceo que comprende:

25 i) proporcionar una célula microbiana transgénica según la reivindicación 8 que expresa una metiltransferasa según la reivindicación 1 en un cultivo con al menos un alcaloide opiáceo;

ii) cultivar la célula microbiana en condiciones que metilan uno o más alcaloides opiáceos; y opcionalmente

iii) aislar dicho alcaloide metilado de la célula microbiana o cultivo celular.

30 13. El uso de un gen codificado por una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de ácido nucleico en la figura 3a, 3b o 3c, o una molécula de ácido nucleico que es 90 % idéntica y que se hibrida, en condiciones de hibridación muy estrictas, con la secuencia de nucleótidos en la figura 3a, 3b o 3c y codifica un polipéptido con actividad de metiltransferasa como un medio para identificar la presencia o ausencia de un gen que codifica una metiltransferasa en una planta de *Papaveraceae* o como un medio para identificar un locus, donde dicho

35 locus está asociado con una expresión o actividad alterada de dicha metiltransferasa en una planta de *Papaveraceae*.

14. Un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un gen que codifica un polipéptido de metiltransferasa en una variedad de *Papaveraceae* que comprende:

40 i) obtener una muestra de una planta de *Papaveraceae*;

ii) extraer ADN genómico de la planta; y

iii) analizar el ADN genómico en búsqueda de la presencia de un gen que comprende o que consiste en una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 3a, 3b o 3c.

45 15. Un procedimiento para el análisis de una planta de *Papaver* mutageneizada, que comprende:

i) obtener una muestra de la planta mutageneizada y analizar la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en:

50 a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 3a, 3b o 3c;

b) una molécula de ácido nucleico que se hibrida con la molécula de ácido nucleico en a) bajo condiciones de hibridación muy rigurosas y que codifica un polipéptido según la reivindicación 1; y

55 c) comparar la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico en dicha muestra con una secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de la planta original de tipo silvestre; por

ii) extraer ácido nucleico de dichas plantas mutadas;

iii) amplificar una parte de dicha molécula de ácido nucleico mediante una reacción en cadena de polimerasa;

60 iv) formar una preparación que comprende el ácido nucleico amplificado y el ácido nucleico extraído de la semilla de tipo silvestre para formar ácido nucleico heterodúplex;

v) incubar dicha preparación con una nucleasa monocatenaria que corta en una región de ácido nucleico heterodúplex para identificar el desfase en dicho heterodúplex; y
vi) determinar el sitio del desfase en dicho heterodúplex de ácido nucleico.

5 16. Una planta, donde dicha planta comprende un vector viral que incluye una molécula de ácido nucleico, donde dicha molécula de ácido nucleico comprende un gen que codifica un polipéptido de metiltransferasa, donde dicho gen está codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en:

10 i) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en la figura 1a, 1b o 1c; o
ii) una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3.

17. Un vector viral que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3.

Figura 1a

ATGGCTACCAATGGCGAAATTTTCAATACCTATGGTCATAATCATCAATCAGCCACAGTCACTAAAATCACTGCT
 TCTAATGAAAGCAGCAATGGTGTCTGTTATCTTTCAGAAAACGGCTAACTTGGGGAAAGTAAATATGCATTCCAATG
 GCCTAAGAGCTGCGATGGAGCTAAATGTGTTCCAACCTATCTCAAAGTTCGGAACTGACGCAAAAAGTTTCGGCT
 TCTGAAATGGCTCTAAAATGCCAAACGCGAAGAATAATCCTGAAGCAGCTATGTATTTGGATAGAATTCTTCGA
 CTGCTCGGGGCAAGTCTATTCTTTCTGTTTCTACTACAAAAAATCAATCAACAGAGGAGGAGATGATGTAGTA
 GTACATGAGAAGCTTTATGGGTTAACAAATTCGTCGTGTTGTTGGTCCCTCGACAAGAAGACGGGGTGTCAATTA
 GTCGAAGAATTGCTATTCACATCTGACAAGGTTGTTGTGGATAGTTTTTTCAAACCTGAAATGTGTGGTGAAGAA
 AAAGACAGTGTGCCATTTGAGGTTGCTCATGGTGTAAAATCTTTGAGTATGCTGTACAGAACCAAGAATGAAT
 CAAGTATTTAACGATGGAATGGCAGTTTTCTCTATTGTTGTTTTGAGGCTGTTTTAGAGTTTACGATGGATTT
 CTTGATATGAAAGAATTGTTAGATGTTGGTGGTATTGGTACTTCGGTTAGTAAGATTGTTGCTAAATACCCCT
 TTGATTGCGGGTGTCAACTTCGACTTGCCTCATGTTATTTCTGTTGCCCTCAATACCCAGGTGTAGAGCATGTT
 GCAGGAGATATGTTGAGGAAGTCCCAAAGGGTCAAAACATGTTGCTAAAATGGGTACTGCACGATTGGGGTGT
 GAACGATGTGTGAAGCTGTTAAAGAATTGTTGGAACCTATTACCTGTGGGTGAAAAAGTTTTGATAATCGAGTTT
 GTTCTCCCGAATGAACTTGGTAACAATGCTGAATCATTCAATGCGTTGATTCCCGATTTACTCCTGATGGCTCTG
 AATCCAGGCGGTAAAGAGCGAACGATTTCCGAATACGATGATTTAGGCAAAGCAGCTGGATTCAAAAACTATA
 CCTATCCCTATCTCCAATGGTCTTCATGTCAATTGAGTTTCACAAATGA

Figura 1b

ATGGAATTCATTTAGAAAGCCAAGAACAAGAAATGAAATATCAATCTCAAATCTGGAACCAAAATATGTGGCACT
 GTTGATACCTCTGTTCTGAGATGTGCAATTCAAATTAGGTATATTTGATGCCATTCATAACTCTGGCAAACCAATG
 ATTACCTTAACCGAATTATCAAGCATTGTTTCATCACCCCTCTTCATCTTCAATCGAACCCCTGCAACTTGTATAGA
 TTAGTGAGATACTTATCCCAAATGGATCTCATTAGTATCGGAGAATGTTTGAATGAAGCAACTGTTTCATTAACA
 GGCACATCCAAGTTACTACTTAGAAACCAAGAAAAGAGTTTAAATTGATTGGGTATTGGCAATTTCTTGCGAAATG
 ATGGTTGTTGTTTGGCACGAACCTAAGTAGCTCTGTTTCAAACCTCTGCGGATGAGCTCCAATCTTCCAGAAGGTT
 CATGGTAAAAATGCTTTAGAATTAGCAGGGGAATTTCCAGAATGGAATGATCTGATCAACAATGCTATGACTAGT
 GATACTAGTGTAACTAAGCCAGCGCTAATACAGGATGTGGCAAAATCCTGAACGGAGTTACATCGTTAATTGAT
 GTCGGTGGTGGTTCACGGTGCCTACTAGTTGAAGCTTTTCCACATAAAAAGGTGCGGTAATCGAT
 TTACCACATGTTGTTGAAGCCGCTCCGGAGCGTCCAGGTGTTGAGTTCATCAGCGGTGATATATCAAGTCCATT
 TCTAACGCTGATGCTGTGTTGTTGAAGTATGTTCTGCACAATTTGGGAAGATACGGAATGTGTGAATTTACTGAAG
 AGATGTAAGGAAGCAGTTCCGGCAGACAAAAGGAAAAGTATCATAATGGATTTAGTAATAGACGACGATGATAAC
 AGTATTTTAAACGAGGCAAGGTTGAGCCTTGATCTCACTGTGATGAACCATGGAGGAGGTAGAGAAAAGGACTAAA
 GAAGATTGGAGAAAATCTAATTGAGATGCTGGATTAGTAGGCATGAAATAATTCCAATATCTGCCATGCCATCA
 ATTATTGTTGCTTATCCTTAG

Figura 1c

ATGGAAGTAGTAAGTAAGATTGATCAAGAAAACCAAGCAAAAATTTGGAAACAAATTTTTGGTTTTGCAGAATCA
 TTAGTTCTAAAATGTGCAGTTTCAAGTATGAGATTGCTGAAACACTTCATAATAATGTA AAAACCCATGTCTTTATCC
 GAGTTAGCATCTAAACTTCCGGCTCAACCCGTTAATGAAGACCGTTTGTACCGAATCTGCATTTCTTAGTTTAC
 ATGAAACTCTTCAACAAAGATGCTACCACACAGAAATATTCAATTAGCTCCACCAGCAAAGTATTTGCTAAAAGGC
 TGGGAAAAATCAATGGTTCCCTTCAATATTAAGCGTGACTGATAAAGATTTTACAGCTCCATGGAATCATCTTGGG
 GACGGTTTTAACCGGTAACGTAAACGCTTTTGAAGAAAGCGTTAGGAAAGGGCATTCCGGGTTTATATGAGAGAAAAT
 CCTGAAAAAGATCAATGTTTAAATGAAGGAATGGCTTGTGATACTAGATTATTTGCTTCAGCATTGGTTAACGAG
 TGCAAAAGTATTTTCAGTGACGGGATCAATACACTTGCCGGTGTGGCCGTGGTACTGGTACTGCAGTGAAAGCC
 ATATCCAAAGCTTTTCCGGATATTAAGTGCACAATCCATGATCTTCTGAAGTTACCAGTAAAAATAGTAAAATT
 CCAAGAGATGTTTTAAGTCCGTTCCCTAGTGCAGACGCCATCTTTATGAAGAGCATTTCTTACGAATGGAACGAT
 GAGGAATGTATTTCAAATCTTGAACGATGCAAGAAGCAATACAAAAGGGGGCAAAGTTATCATTGCGGATGTC
 GTAATAGACATGGACTCGACTCATCCGATTTCAAAAATCTAGACTCGCAATGGATTTGGCTATGATGCTCCACAG
 GGTGAAAAAGAGAGAACTGAAGAAGATTGGAAAAAATTTATTGATGCTGCAGTTTTGCTAGCTGTAAAATTACT
 AAATATCTGCTCTCCAGTCTGTTATTGAGGCTTACCCCTCATTGA

Figura 2

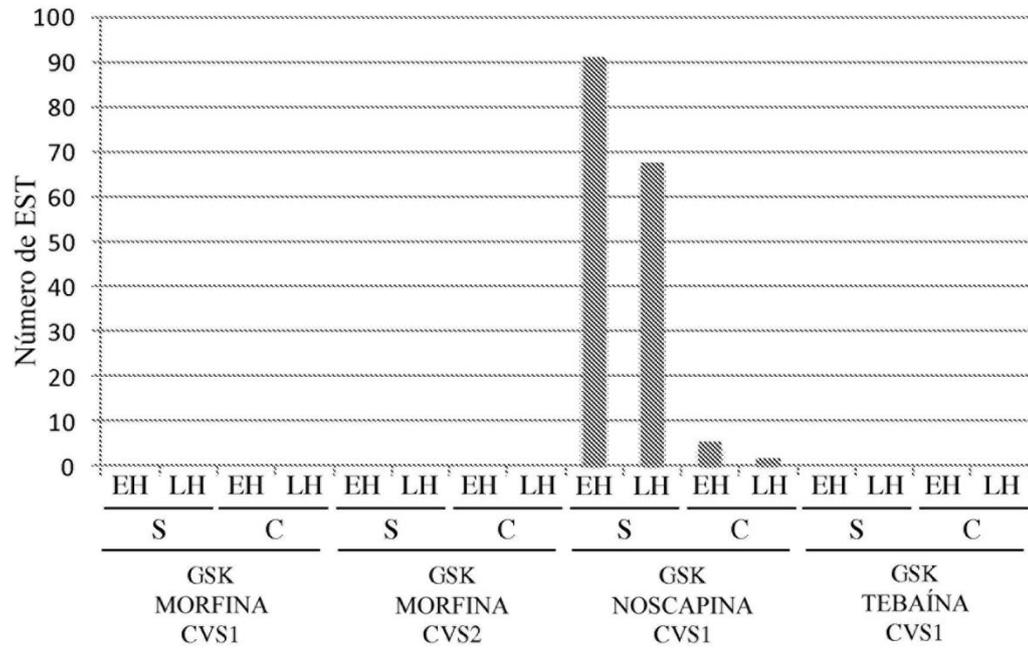


Figura 3a

Inicio	Finalización	Característica
1	66	5' región no traducida
67	877	exón 1
878	993	intrón 1
994	1058	exón 2
1059	1841	intrón 2
1842	2138	exón 3
2139	2306	3' región no traducida

CACACCAAACTTGATCATTGTCATAAAAAACAGTCCTAATTGTCATCAATCAAAAACAGTCCTAACATGGCTACC
 AATGGCGAAATTTTCAATACCTATGGTCATAATCATCAATCAGCCACAGTCACTAAAATCACTGCTTCTAATGAA
 AGCAGCAATGGTGTCTGTTATCTTTTCAGAAACGGCTAACTTGGGGAAGTTAATATGCATTCCAATGGCACTAAGA
 GCTGCGATGGAGCTAAATGTGTTCCAACCTTATCTCAAAGTTCGGAAC TGACGCAAAAGTTTCGGCTTCTGAAATT
 GCCTCTAAAATGCCAAACGCGAAGAATAATCCTGAAGCAGCTATGTATTTGGATAGAATTCTTCGACTGCTCGGG
 GCAAGTCTATTCTTTCTGTTTCTACTACAAAAAATCAATCAACAGAGGAGGAGATGATGTAGTAGTACATGAG
 AAGCTTTATGGGTTAACAAATTCGTCGTTGTTGGTCCCTCGACAAGAAGACGGGGTGTCTATTAGTCGAAGAA
 TTGCTATTCACATCTGACAAGGTTGTTGTGGATAGTTTTTCAAAC TGAAATGTGTGGTGGGAAGAAAAGACAGT
 GTGCCATTTGAGGTTGCTCATGGTGTCAAATCTTTGAGTATGCTGCTACAGAACCAAGAATGAATCAAGTATTT
 AACGATGGAAATGGCAGTTTTCTCTATTGTTGTTTTGAGGCTGTTTTTAGAGTTTACGATGGATTCTTGATATG
 AAAGAATTGTTAGATGTTGGTGGTGGTATTGGTACTTCGGTTAGTAAGATTGTTGCTAAATACCCTTTGATTCCG
 GGTGTCAACTTCGACTTGCCCATGTTAATTTCTGTTGCCCTCAATACCCAGGTATACCTTCTTCTTTTTTTC
 TGAAGAAGACGGGTTCGAATTTTTTACAGAATTTTTTTTCTCATTTCGATACCAAGCAACTCTATTTAAAGTATACT
 GTGTAATAATGCATGCAGGTGTAGAGCATGTTGCAGGAGATATGTTCCGAGGAAGTCCCAAAGGGTCAAAAACATGT
 TGCTAAAAGTAAGCTAACCACTCAATTTTCTTAATAATTAGGAAAATTGCAAAAACCGTCACAATATTATAAA
 GGCATCTGAAGTGCCATCACCTCAGATACCGATGCTATGTACTCTATACATTGACAAAATTCATGGTATCAAGTC
 TCAACCTGCCGGTTATAATAATTTTTTTCAGGCTTCTTTAAAAGAAATTTATTTGAATGGTAAAAATCATCATT
 ATATTGGAGAAAAGTGCAGATCTTGCTACATTAATAATTTATAATATAATAAAACATTTGTTTTATGGTTGTTTGA
 AAAAAAATCTCATTGTTAATGCATCTTTCTAAGTTAATGGTGATTAATGGTGAATAATATGATACTTATTACC
 GTCTTGACACTTTTTTTTTTTCGTAGACAAAATATTTCCAACTTTTCTATATTAATAAAAATCAGAAATATTTCA
 TTTATATGAATATTAATAAAGAAGGTGCATGAGTAATATTTCAAATTTCTTAAAGCGTTTTTTTTATAGCAGTACG
 GCGTTTTCTCAAATCTTATTAACCCATAATTAAGGGTTCCGTAAATTAATTTGAGGGATATCAAAAACAAAAC
 AAAAAATAGGGTTATTTTGCAGTAAAATCAATAACCCCTTATCATATGAAAAGGATAACTTAGTCTACCCCAATT
 TGGAGAGATATGGGCAATTAATTGTATTACTAGTTCGTTTGGAGCATTGATAATTTTTTCATTAGATTATACTCA
 ATAAAATATATGAACATATTTGATAAAGATTAATAATGCAGTGGGTACTGCACGATTGGGGTGTGAAACGATGTG
 TGAAGCTGTTAAAGAATTGTTGGAACCTATTACCTGTGGGTGAAAAGTTTTGATAATCGAGTTTGTCTCCCGA
 ATGAACCTGGTAACAATGCTGAATCATTCAATGCGTTGATTCCCGATTTACTCCTGATGGCTCGAATCCAGGCG
GTAAAGAGCGAACGATTTCCGAATACGATGATTTAGGCAAAGCAGCTGGATTCATAAAAACTATACCTATCCCTA
TCTCCAATGGTCTTCATGTCATTGAGTTTCACAAATGAATGGTTATTGAGTGCTTTGGTAATTAACCTACCAAGA
TAACTACATCCATTTCATGCAATTTGCTTTTTTTTTTCTTTTTTTCTTTTTTTCTTTTTTTGTTTTGTATTCCA
 GGTGTGAAC TAGTTAGTGTGTGAGTGGACAAAAGTAAGTAATCGTATTTTGTGTT

Figura 3b

Inicio	Finalización	Característica
1	74	5' región no traducida
75	851	exón 1
852	938	intrón
939	1232	exón 2
1233	1440	3' región no traducida

GAATCAGAACTTTCTTCTAAAATCTTTCAATACCAGTACTGTTAGTTTCCGATAAGAGCCACACTAA
TCCATTATGGAAATTCATTTAGAAAAGCCAAGAACAAGAAATGAAATATCAATCTCAAATCTGGAACCA
AATATGTGGCACTGTTGATACCTCTGTTCTGAGATGTGCAATTCAATTAGGTATATTTGATGCCATTC
ATAACTCTGGCAAACCAATGATTACCTTAACCGAATTATCAAGCATTGTTTCATCACCCCTCTTCATCT
TCAATCGAACCCCTGCAACTTGTATAGATTAGTGAGATACTTATCCCAAATGGATCTCATTAGTATCGG
AGAATGTTTGAATGAAGCAACTGTTTCATTAACAGGCACATCCAAGTTACTACTTAGAAAACCAAGAAA
AGAGTTTAATTGATTGGGTATTGGCAATTTCTTGCAGAAATGATGGTTGTTGTTTGGCACGAACCTAAGT
AGCTCTGTTTCAACTCCTGCGGATGAGCCTCCAATCTTCCAGAAGGTTTCATGGTAAAAATGCTTTAGA
ATTAGCAGGGGAATTTCCAGAATGGAATGATCTGATCAACAATGCTATGACTAGTGATACTAGTGTA
CTAAGCCAGCGCTAATACAAGGATGTGGCAAAAATCCTGAACGGAGTTACATCGTTAATTGATGTGCGGT
GGTGGTCACGGTGCCACTATGGCCTACATAGTTGAAGCTTTTCCCTCACATAAAAAGGTGCGGTAATCGA
TTTACCACATGTTGTTGAAGCCGCTCCGGAGCGTCCAGGTGTTGAGTTCATCAGCGGTGATATATTCA
AGTCCATTTCTAACGCTGATGCTGTGTTGTTGAAGGTATGTAAAGAGTAGCTAACCTTAGTGCGTCTA
ATTTATTCCACAAATTTTTCTGATGCATTTTATTCTTATTTTTGGTTTTTGCAGTATGTCCTGCACAA
TTGGGAAGATACGGAATGTGTGAATTTACTGAAGAGATGTAAGGAAGCAGTCCGGCAGACAAAGGAA
AAGTGATCATAATGGATTTAGTAATAGACGACGATGATAACAGTATTTAACGCAGGCAAAGTTGAGC
CTTGATCTCACTGTGATGAACCATGGAGGAGGTAGAGAAAAGGACTAAAGAAGATTGGAGAAATCTAAT
TGAGATGTCTGGATTTAGTAGGCATGAAATAATTCCAATATCTGCCATGCCATCAATTATTGTTGCTT
ATCCTTAGTTAAGTCACCCGCATGTTTACTTGAACGGGAATAAGTTGGGGCGTGTTGAATCTGTTAA
CATCGCAATTGTGCCTTTACTTTATGCATTCTCATTCCGGTAGAAAATGTTTGGGGCATTCCGATTCT
GCTGAGCCCTTTTATGTATGTTTGTGTTGGTTGGTTGGTTTTCAAGTAACTGAAGTTTCTTCTCTG
TTTTCAAGGCAT

Figura 3c

Inicio	Finalización	Característica
1	120	5' región no traducida
121	846	exón 1
847	994	intrón
995	1288	exón 2
1289	1436	3' región no traducida

AAGTTGCAGGTAGGGTTATGAGCAAGCTCAATTATCTCTCTATAAAAAGCTAACATTAGAAAACTAA
 TAAGCACACAAAACCGTAAAAAGTTCTGAAGATAGACAAAACAAGAGAAAAAAGATGGAAGTAGTAAGTA
 AGATTGATCAAGAAAACCAAGCAAAAATTTGGAAACAAATTTTTGGTTTTGCAGAATCATTAGTTCTA
 AAATGTGCAGTTCAGTTAGAGATTGCTGAAACACTTCATAATAATGTAAAACCCATGTCTTTATCCGA
 GTTAGCATCTAAACTTCCGGCTCAACCCGTTAATGAAGACCGTTTGTACCGAATTCTGCATTTCTTAG
 TTCACATGAAACTCTTCAACAAAAGATGCTACCACACAGAAATATTCATTAGCTCCACCAGCAAAGTAT
 TTGCTAAAAGGCTGGGAAAAATCAATGGTTCCTTCAATATTAAGCGTGACTGATAAAGATTTTACAGC
 TCCATGGAATCATCTTGGGGACGGTTTAACCGGTAACGTAAACGCTTTTGAGAAAAGCGTTAGGAAAGG
 GCATTCGGGTTTATATGAGAGAAAAATCCTGAAAAAGATCAATTGTTTAATGAAGGAATGGCTTGTGAT
 ACTAGATTATTTGCTTCAGCATTGGTTAACGAGTGCAAAAGTATTTTCAGTGACGGGATCAATACACT
 TGCCGGTGTGGCCGTGGTACTGGTACTGCAGTGAAAGCCATATCCAAAGCTTTTCCGGATATTAAGT
 GCACAATCCATGATCTTCTGAAGTTACCAGTAAAAATAGTAAAATTTCCAAGAGATGTTTTTAAGTCC
 GTTCCTAGTGCAGACGCCATCTTTATGAAGGTAACCTTCTAAGAAAATTTGTTTTAGAATATTCGTTGC
 AACTCTAATTGACAACATTCATAAAAAATATGTTAATGGTCTTAATTTATTAATTCTAGTAGAGTTAC
 TTAAATGATATACAAAAATTCAAAATCATATAACATTTGCAGAGCATTCTTCACGAATGGAACGATGA
 GGAATGTATTCAAATCTTGAAACGATGCAAAGAAGCAATACCAAAGGGGGCAAAGTTATCATTGCGG
 ATGTCGTAATAGACATGGACTCGACTCATCCGTATTCAAAATCTAGACTCGCAATGGATTTGGCTATG
 ATGCTCCACACGGGTGGAAAAGAGAGAAGTGAAGAAGATTGGAAAAAACTTATTGATGCTGCAGGTTT
 TGCTAGCTGTAAAATTAATAACTATCTGCTCTCCAGTCTGTTATTGAGGCTTACCCTCATTGAGGAT
 AATTTTTATCCTTCTGTTTTCCCTTTGGTTAATTGTTGCCTTCTCTTTGGATCATGGTTGCGTTTATA
 ATAAATGCAGCGTTTCTTTCCCTGGCGGTAAGTGCAAGAAAAGAAAAAGCTTCCAGAACTTCCTTGAGT
 ATGCCTGG

Figura 4a

MATNGEIFNTYGHNHQSATVTKITASNESSNGVCYLSETANLGKLCIPMALRAAMELNVFQLISKFGTDAKVSA
 SEIASKMPNAKNPEAAMYLDRI LRLLGASSILSVSTTKK SINRGGDDVVVHEKLYGLTNSSCCLVPRQEDGVSL
 VEELLFTSDKVVVDSFFK LKCVVEEKDSVPFEVAHGAKIFEYAATEPRMNQVFNDGMAVFSIVVFEAVFRVYDGF
 LDMKELLDVGGGIGT SVSKI VAKYPLIRGVNFDLPHVISVAPQYPGVEHVAGDMFEEV PKGQNM LLLKWLHDWGD
 ERCVKLLKNCWNSLPVGGKVLIIIEFVLPNELGNNAESFNALIPDLLLMLNPGGKERTISEYDDLGAAGFIKTI
 PIPISNGLHVIEFHK.

Figura 4b

MEIHLESQEQEMKYQSQIWNQICGTVDTSVLRCAIQLGIFDAIHNSGKPMITLTELSSIVSSPSSSSIEPCNLYR
 LVRYLSQMDLISIGECLEATVSLTGT SKLLLRNQEKSLIDWVLAISCEMMVVVWHELSSSVSTPADEPPIFQKV
 HGKNALELAGEFPEWNDL INNAMTSDTSVTKPALIQCGKILNGVTS LIDVGGGHGATMAYIVEAFPHIKGAVID
 LPHVVEAAPERPGEV F ISGDI FKSISNADAVLLKYVLHNWEDTECVNLLKRCKEAVPADKGKVIIMDLVIDDDDN
 SILTQAKLSLDLTVMNHGGGRERTKEDWRNLIEMSGFSRHEIIPISAMP SIIIVAYP

Figura 4c

MEVVS KIDQENQAKIWKQIFGFAESLVLKCAVQLEIAETLHNNVKPMSLSELASKLPAQPVNEDRLYRILHFLVH
 MKLFNKDATTQKYS LAPPAYLLKGWEKSMVPSILSVTDKDF TAPWNHLDGLTGNCNAFEKALGKGIRVYMREN
 PEKDQLFNEGMACDTRLFASALVNECKSIFSDGINTLAGVGRGTAVKAI SKAFD IKCTI HDLPEVTSKNSKI
 PRDVFKSVPSADAI FMKSLIHEW NDEECIQILKRCKEAIPKGGKVI IADVVIDMDSTHPYSKSR LAMD LAMMLHT
 GGKERTEDWKKLIDAAGFASCKITKLSALQS VIEAYPH

Figura 5

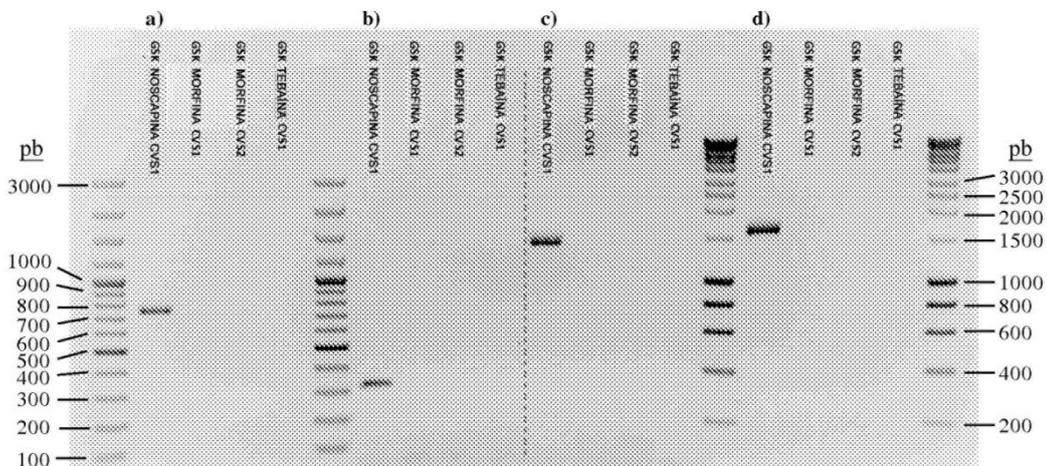


Figura 6a

F2: GSK TEBÁINA CVS1 X GSK NOSCAPINA CVS				
SUMA	Noscapina +		Noscapina -	
	61		215	
276	<i>PSMT1+</i>	<i>PSMT1-</i>	<i>PSMT1+</i>	<i>PSMT1-</i>
	61	0	131	84
SUMA	<i>PSMT1+</i>		<i>PSMT1-</i>	
	192		84	
276	Noscapina +	Noscapina -	Noscapina +	Noscapina -
	61	131	0	84

Figura 6b

F2: GSK TEBÁINA CVS1 X GSK NOSCAPINA CVS				
SUMA	Noscapina +		Noscapina -	
	61		215	
276	<i>PSMT2+</i>	<i>PSMT2-</i>	<i>PSMT2+</i>	<i>PSMT2-</i>
	59*	0	127**	84
SUMA	<i>PSMT2+</i>		<i>PSMT2-</i>	
	186***		84	
276	Noscapina +	Noscapina -	Noscapina +	Noscapina -
	61	131	0	84

* dos ensayos de genotipado fallaron; ** cuatro ensayos de genotipado fallaron; ***en total, el ensayo de genotipado de *PSMT2* falló en las muestras de ADN de seis plantas de F2 con resultados positivos para *PSMT1* y *PSMT3* (Figuras 6a y 6c)

Figura 6c

F2: GSK TEBÁINA CVS1 X GSK NOSCAPINA CVS				
SUMA	Noscapina +		Noscapina -	
	61		215	
276	<i>PSMT3 +</i>	<i>PSMT3 -</i>	<i>PSMT3 +</i>	<i>PSMT3 -</i>
	61	0	131	84
SUMA	<i>PSMT3+</i>		<i>PSMT3 -</i>	
	192		84	
276	Noscapina +	Noscapina -	Noscapina +	Noscapina -
	61	131	0	84

Figura 7

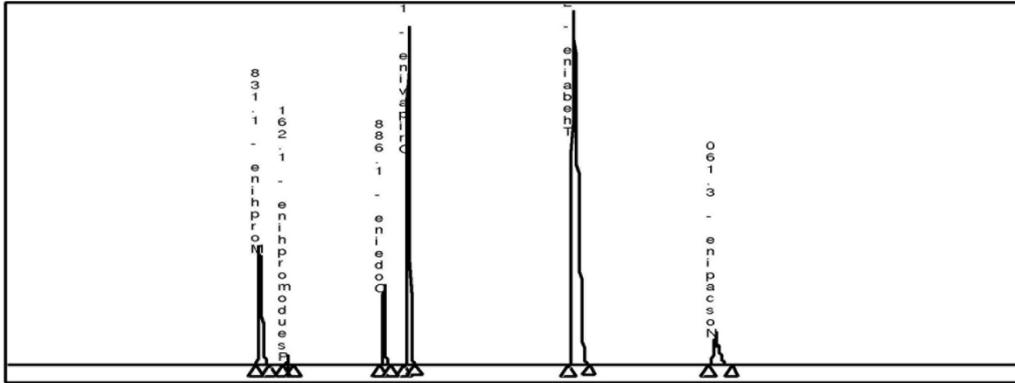


Figura 8

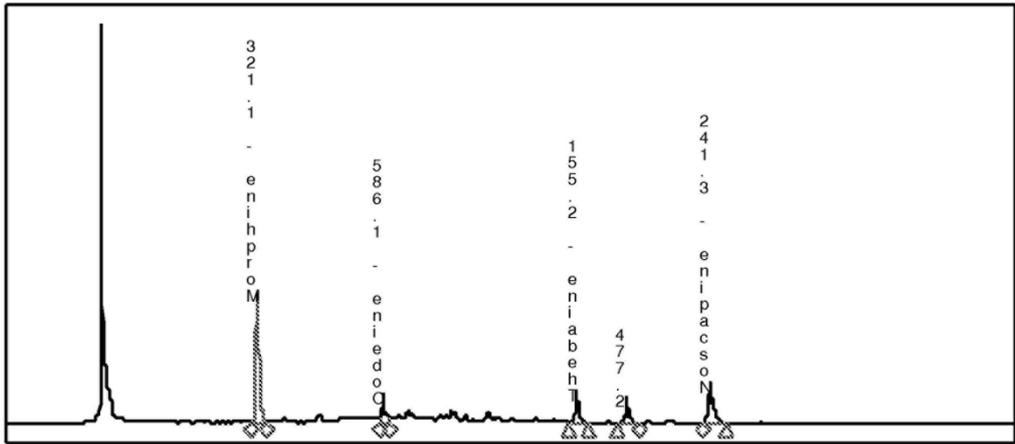


Figura 9

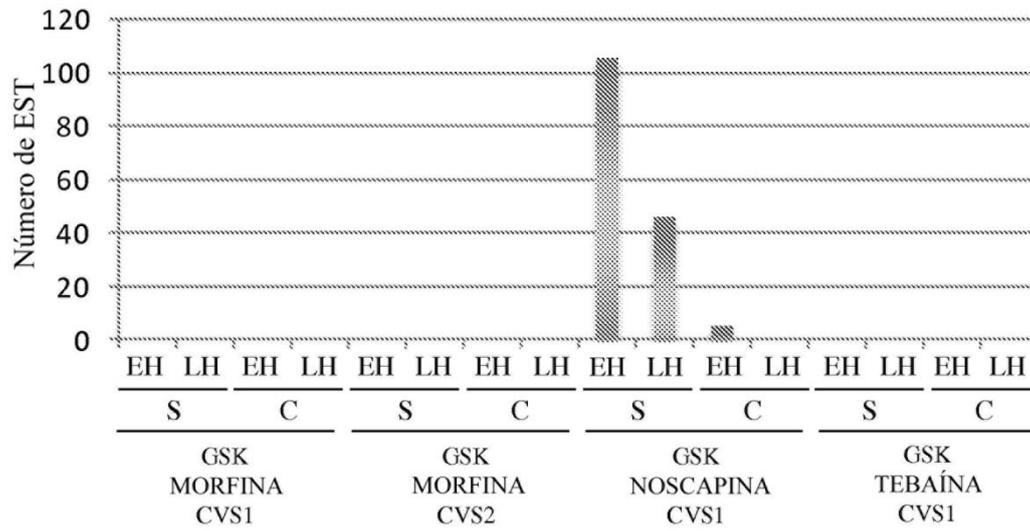


Figura 10

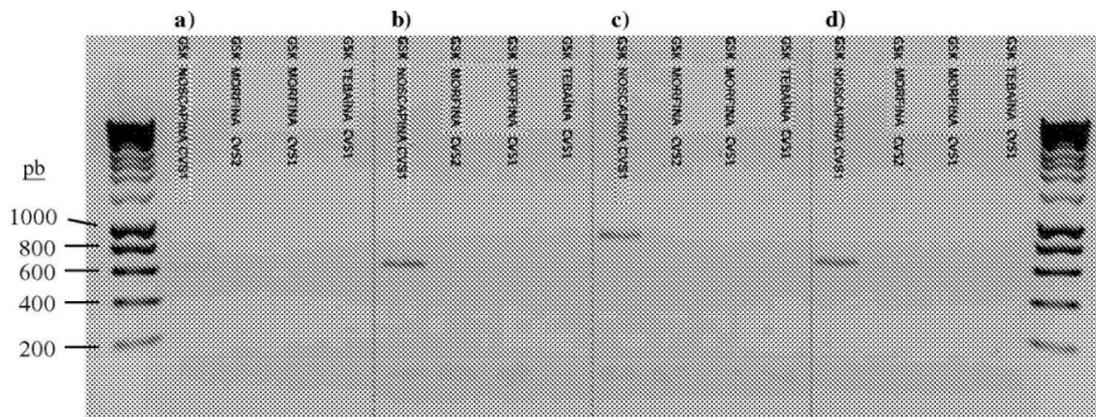


Figura 11

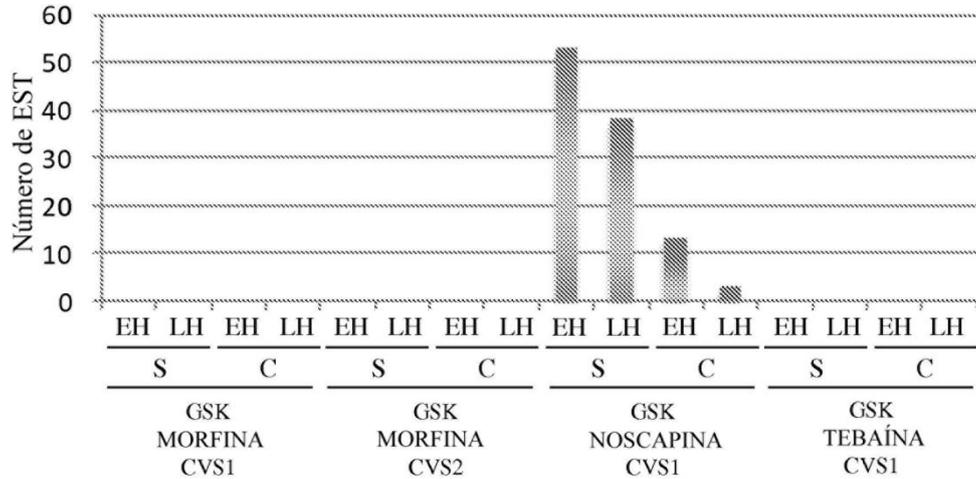


Figura 12

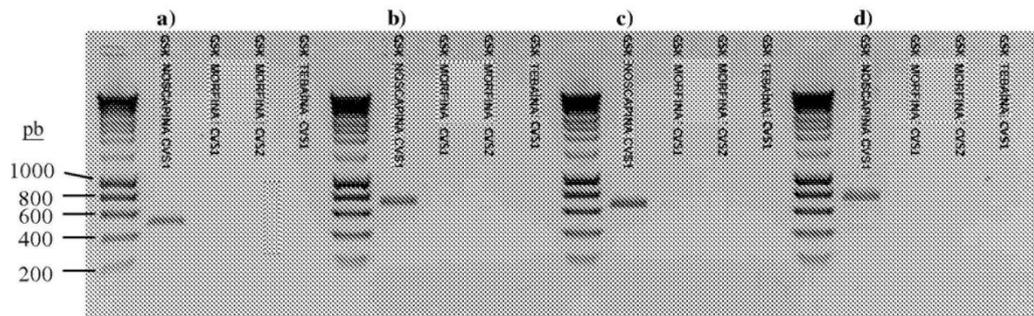


Figura 13

GAGGTGTTTCATTGCCATGTCAAAGGCATTAACCTTCATAAACCCAGATGAGCTTTCGATGCAGTGCATTTTGATA
 GCTTTGAACCGTTTCCTTCAGGAAAAGCATGGTTCCAAGATGGCCTTTTGTAGATGGTAATCCTCCCAGAGACTT
 TGCAAGCCGGTCGTGGATCATATAGAGTCACTTGGCGGTGAAGTCCGTCTCAATCCAGGATTA AAAAGATTGAG
 CTTAAAAAGATGGTACTGTGAAACGTCTAATGCTCACCAACGGTGATGCAATAGAAGGAGATGCTTATGTCATT
 GCAACCCAGTGGACATCCTAAAGCTGCTTATACCCGAGGAGTGGAAAAGAAGTTGGGTACTTTAAAAGATTGGAT
 AAATTAGTTGGAGTTCCTGTGATTAACGTCCATATATGGTTTGACAGGAAATTGAAAAATACATATGATCATCTT
CTCTTCAGCAGAAGTCCCCTCTTAAGCGTATACGCTGACATGTCAGTGACATGCAAGGAATATTATGACCCAAAC
AAATCCATGCTTGAGTTGGTATTTGCACCCGCTGAGGAATGGATCTCGCGCAGTGACTCTGAAATTATTGAAGCT
 ACTATGCAGGAGCTTGCGAAAC

Figura 14

TGGTCATAATCATCAATCAGCCACAGTCACTAAAATCACTGCTTCTAATGAAAGCAGCAATGGTGTCTGTTATCT
 TTCAGAAAACGGCTAACTTGGGGAAGTTAATATGCATTCCAATGGCCTAAGAGCTGCGATGGAGCTAAATGTGTT
 CCAACTTATCTCAAAGTTCGGAAGTACGCAAAAGTTTCGGCTTCTGAAATTGCCCTAAAATGCCAAACGCGAA
 GAATAATCCTGAAGCAGCTATGTATTTGGATAGAATCTTCGACTGCTCGGGCAAGTCTATCTTTCTGTTTC
 TACTACAAAAAATCAATCAACAGAGGAGGAGATGATGTAGTAGTACATG

Figura 15

GTGTAAC TAAGCCAGCGCTAATACAAGGATGTGGCAAATCCTGAACGGAGTTACATCGTTAATTGATGTCGGTG
 GTGGTCACGGTGCCACTATGGCCTACATAGTTGAAGCTTTTCCTCACATAAAAGGTGCGGTAATCGATTACCAC
 ATGTTGTTGAAGCCGCTCCGGAGCGTCCAGGTGTTGAGTTTCATCAGCGGTGATATATTCAAGT

Figura 16

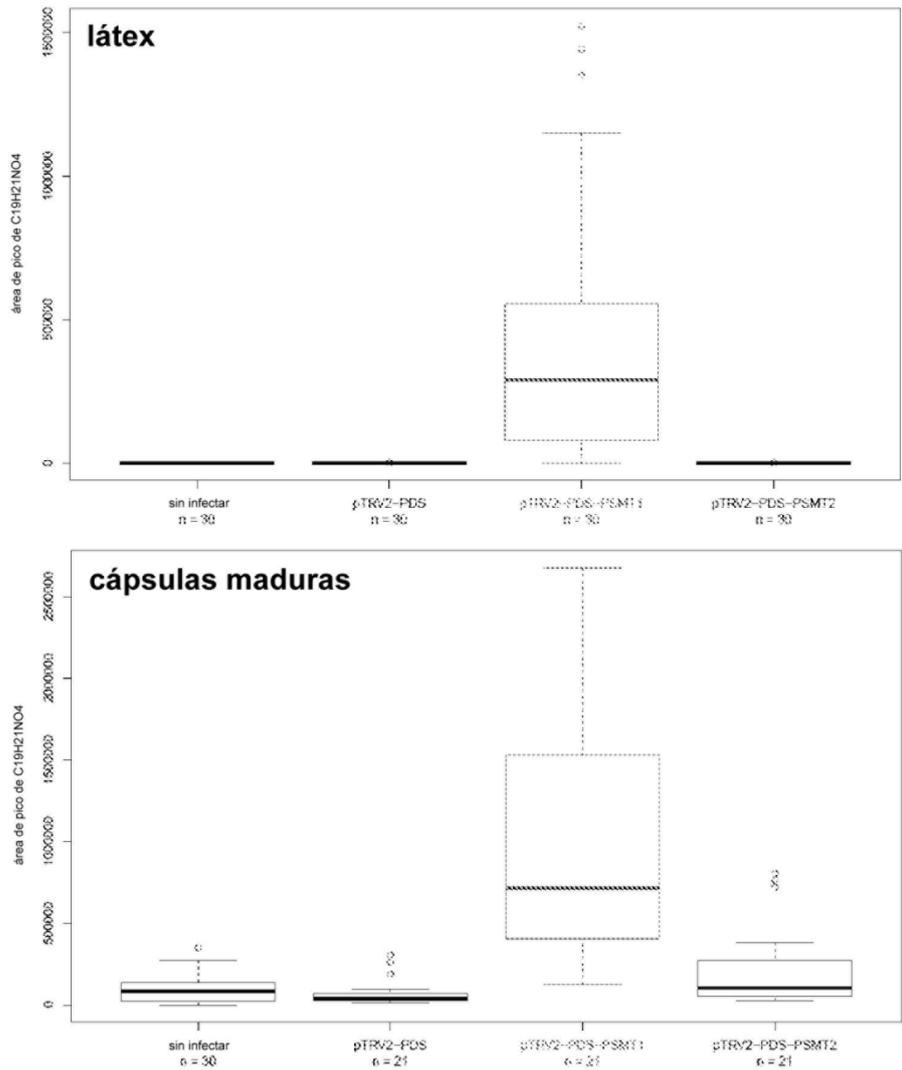


Figura 17

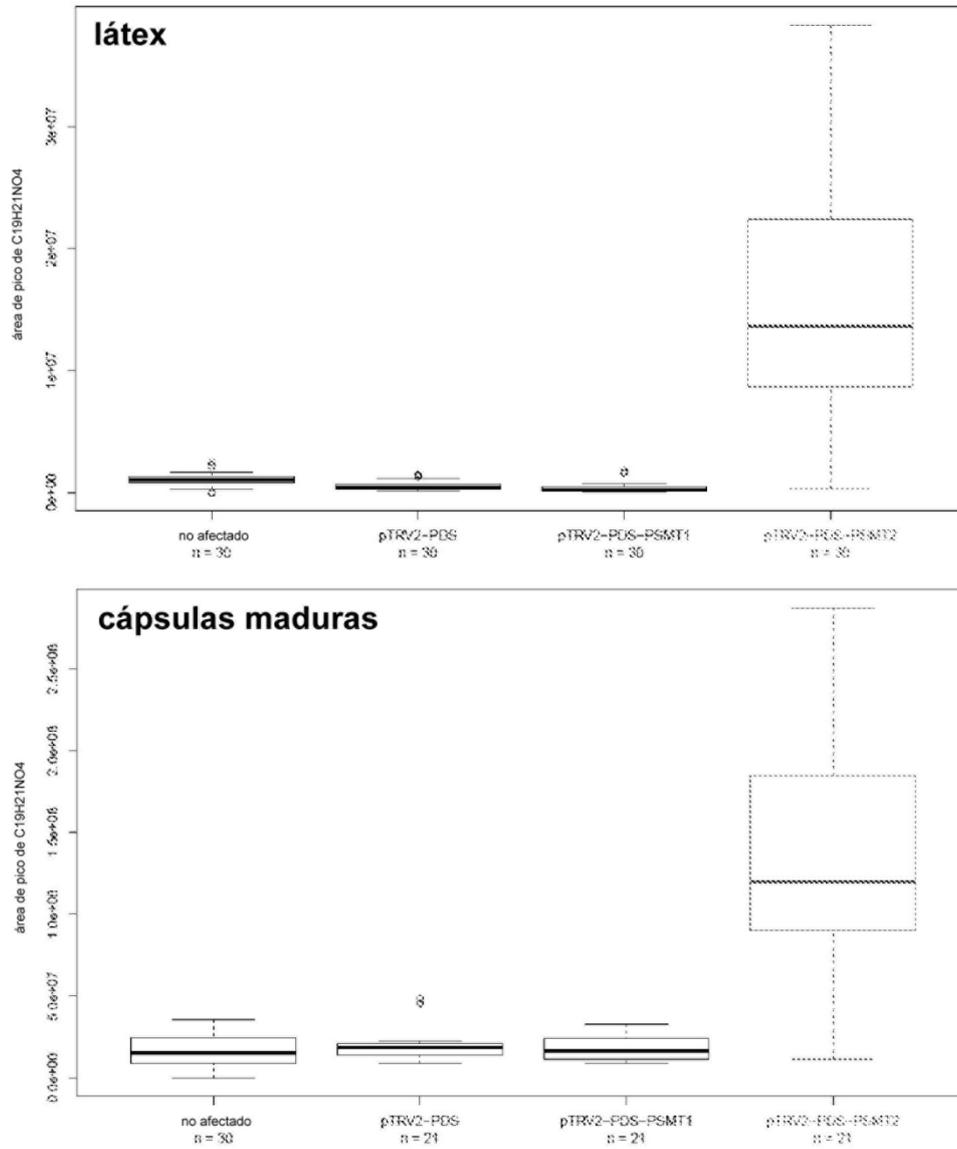


Tabla 1: Secuencias de cebadores directos e inversos usados para amplificar los genes de metiltransferasa del ADN genómico

Gen de metiltransferasa	Nombre del cebador	Secuencias de oligonucleótidos (5'- a 3'-)
PSMT1	PSMT1_F2	CTCTAAAATGCCAAACGCG
	PSMT1_F3	CGTGTGTTTGGTCCCTCG
	PSMT1_F4	GATTCCCGATTACTCCTGATGG
	PSMT1_F5	TGCCTCATGTTATTCTGTTGCC
	PSMT1_F6	CACACCAAACCTTGATCATTGTC
	PSMT1_R1	GCACACTGTCTTTTCTTCCACC
	PSMT1_R2	GACCCTTTGGGACTTCCTCG
	PSMT1_R3	AAATCGTTCGCTCTTTACCGC
	PSMT1_R4	AACACAAAATACGATTACTTACTTTGTCC
PSMT1_R5	GCATGAAATGGATGTAGTTATCTTGG	
PSMT2	PSMT2_F1	ATTGTTGATATTGAATCAGAACTTTC
	PSMT2_F2	TCAATACCAGTACTGTTAGTTTCCG
	PSMT2_F4	GCAACTGTTTCATTAACAGGCACATCC
	PSMT2_F5	ATTGATGTCGGTGGTGGTCACG
	PSMT2_R3	CCACATCCTTGATTAGCGCTGGC
	PSMT2_R4	CAGTAAATTCACACATTCCGTATCTTCCC
	PSMT2_R5	ATTCCCGTTC AAGTAAACATGCGG
PSMT2_R6	ACCGGAATGAGAATGCATAAAGTAAAGG	
PSMT3	PSMT3_F1	ATTGTATAGCCAAAGTTCAGGTAGGG
	PSMT3_F2	AGACCGTTTGTACCGAATTCTGC
	PSMT3_F3	GCTTCAGCATTGGTTAACGAGTGC
	PSMT3_F4	GCAGTGAAAGCCATATCCAAGC
	PSMT3_R1	AACCGTCCCAAGATGATTCC
	PSMT3_R2	TCGTTCCATTTCGTGAAGAATGC
	PSMT3_R3	GAGGGTAAGCCTCAATAACAGACTGG
	PSMT3_R5	TTAAGATCACCAGGCATACTCAAGG

Tabla 2: Combinaciones de cebadores usadas para amplificar y someter a la secuenciación de Sanger las metiltransferasas del ADN genómico

Metiltransferasa	Combinación de cebadores	Temperatura de hibridación [°C]	Tiempo de extensión [s]	Cebadores de secuenciación usados para la secuenciación de Sanger del producto de PCR purificado
PSMT1	PSMT1_F2/R2	62	60	PSMT1_F2, PSMT1_R2
	PSMT1_F3/R3	68	60	PSMT1_F3, PSMT1_F5, PSMT1_R3
	PSMT1_F4/R4	66	60	PSMT1_F4, PSMT1_R4
	PSMT1_F5/R5	63,5	60	PSMT1_F5, PSMT1_R3, PSMT1_R5
	PSMT1_F6/R1	62,8	60	PSMT1_F6, PSMT1_R1
PSMT2	PSMT2_F1/R6	60	60	PSMT2_F1, PSMT2_F2, PSMT2_F4, PSMT2_F5, PSMT2_R1, PSMT2_R4, PSMT2_R6
PSMT3	PSMT3_F1/R5	68,5	60	PSMT3_F2, PSMT3_F4, PSMT3_F5, PSMT3_R1, PSMT3_R2, PSMT3_R3

Tabla 3: Combinaciones de cebadores para amplificar las metiltransferasas del PS del ADN genómico

Metiltransferasa	Combinación de cebadores	Temperatura de hibridación [°C]	Tiempo de extensión [s]	Tamaño de fragmento esperado [bp]	Figura
PSMT1	PSMT1_F1/R2	62	60	739	Figura 5a
	PSMT1_F3/R3	66	60	1568	Figura 5b
	PSMT1_F4/R4	68	60	318	Figura 5c
	PSMT1_F5/R5	63,5	60	1354	Figura 5d
	PSMT1_F6/R1	62,8	60	604	Figura 5e
PSMT2	PSMT2_F2/R3	60,3	60	613	Figura 10a
	PSMT2_F4/R4	60,9	60	627	Figura 10b
	PSMT2_F4/R5	61,7	60	909	Figura 10c
	PSMT2_F5/R6	62,8	60	664	Figura 10d
PSMT3	PSMT3_F1/R1	68,5	50	497	Figura 12a
	PSMT3_F2/R2	68,5	50	564	Figura 12b
	PSMT3_F3/R3	68,5	50	511	Figura 12c
	PSMT3_F4/R5	68,5	50	589	Figura 12d

Tabla 4: Cebadores usados para amplificar secuencias seleccionadas para el silenciamiento de genes inducido por virus

Gen meta a silenciar	Nombre del cebador	Secuencias de oligonucleótidos (5'- a 3'-) (en mayúsculas: secuencia específica del gen; en minúsculas: secuencia añadida; subrayado: sitios de restricción)
<i>FITOENO DESATURASA DEL PS</i>	ps_pds_F	GAGGTGTTTCATTGCCATGTCAA
	ps_pds_R4	GTTTCGCAAGCTCCTGCATAGT
<i>METILTRANSFERASA DEL PS 1</i>	VIGS_PSMT1_F	aaactcgagaagctTGGTCATAATCATCAATCAG
	VIGS_PSMT1_R	aaaggtaccCATGTACTACTACATCATCTCC
<i>METILTRANSFERASA DEL PS 2</i>	VIGS_PSMT2_F	aaactcgagaagcttGTGTAACCTAAGCCAGCGC
	VIGS_PSMT2_R	aaaggtaccACTTGAATATATCACCGC