

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

11-888087

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

UNA PLANTA CON INFLORESCENCIA ALTERADA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SUNTORY HOLDINGS LIMITED

DOMICILIO

OSAKA, JAPON

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DEPAEZ

C.C. 35,456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

378.1
19-07-2011

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-088087- -00000-0000

Fecha: 2011-07-14 11:52:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 96**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **SUNTORY HOLDINGS LIMITED**
Sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Japón.Dirección: 1-40, Dojimahama 2-chome,
Kita-ku, Osaka-shi,
Osaka 530-8203,
JapónDomicilio: Osaka,
Japón**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Filippa BRUGLIERA**11 Kalimna Street,
Preston,
Victoria 3072,
Austria

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/AU2009/001659Fecha: 18 de diciembre de 2009Publicación Internacional No. WO 2010/069004 A1Fecha: 24 de junio de 2010

6

Título (54)**UNA PLANTA CON INFLORESCENCIA ALTERADA**

7

Clasificación Internacional (51) C12N 009/010

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐US19 de diciembre de 200861/139,354

9

Comprobante de pago No.: 11-0066799Fecha: 11 de julio de 2011Comprobante de pago No.: 11-00645111Fecha: 01 de julio de 2011Comprobante de pago No.: 11-0064512Fecha: 01 de julio de 2011Comprobante de pago No.: 11-0066746Fecha: 11 de julio de 2011

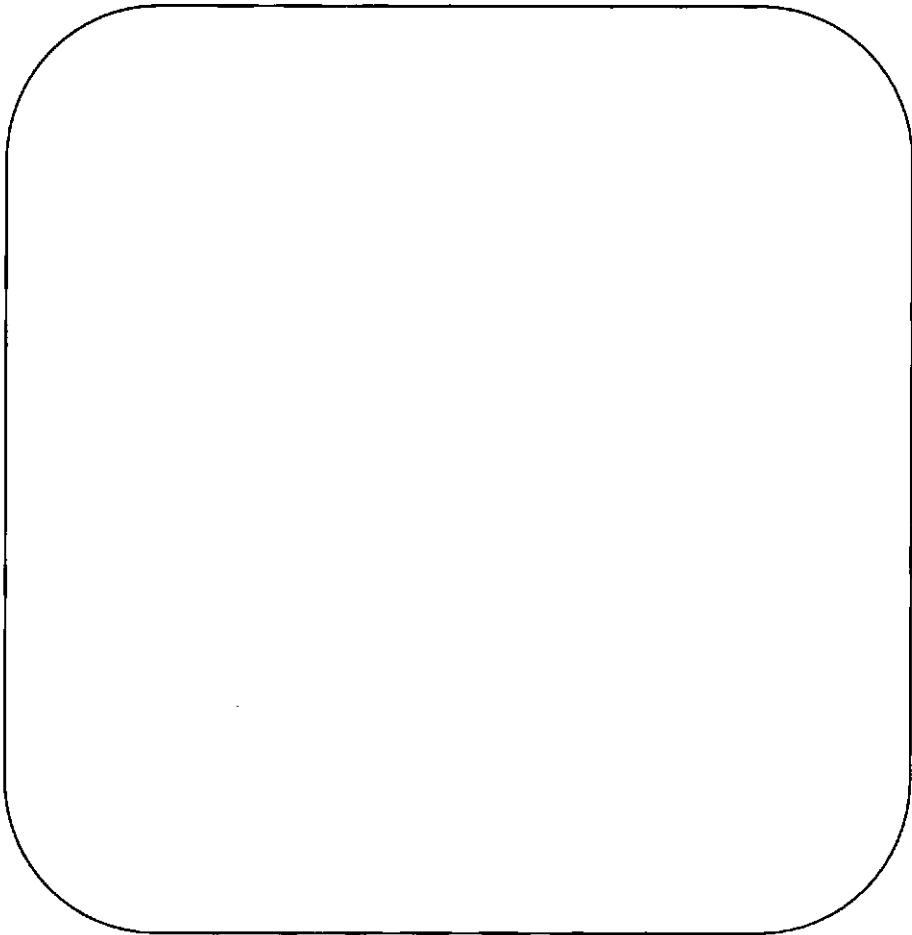
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 17 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$459.000.00.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : *Luz Clemencia De Paez*
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555



SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/069004 A1

Descripción:

Páginas 69 en español

Reivindicaciones: Número (s) 27

Figuras: Número (s) 7

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio del solicitante
INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PTY LTD por SUNTORY HOLDINGS LIMITED.

5. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 June 2010 (24.06.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/069004 A1

- (51) International Patent Classification:
C12N 9/10 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
A01H 5/02 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/AU2009/001659
- (22) International Filing Date:
18 December 2009 (18.12.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/139,354 19 December 2008 (19.12.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PTY LTD [AU/AU]; 1 Park Drive, Bundoora, Victoria 3083 (AU).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): BRUGLIERA, Filip-pa [AU/AU]; 11 Kalimna Street, Preston, Victoria 3072 (AU).
- (74) Agents: HUGHES, E, John, L et al.; Davies Collison Cave, 1 Nicholson Street, Victoria, Melbourne 3000 (AU).

- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: A PLANT WITH ALTERED INFLORESCENCE

(57) Abstract: The invention relates to genetically engineered plants with altered inflorescence. Plants such as spray carnations are transformed with a non-indigenous flavonoid 3', 5' hydroxylase (F3'5'H) and dihydroflavanol-4-reductase (DFR) in conjunction with a genetic suppressor of indigenous DFR. Preferably the substrate specificity of the indigenous DFR is different to the non-indigenous DFR in order to enhance the colour of the inflorescence.



WO 2010/069004 A1

Una Planta con Inflorescencia Alterada

DATOS PARA LA PRESENTACIÓN

[0001] Esta solicitud está asociada con, y reclama prioridad de, la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 61/139,354, presentada el 19 de diciembre de 2008, titulada "Una Planta", cuyos contenidos totales se incorporan en esta especificación por referencia.

CAMPO

[0002] La presente invención se refiere generalmente al campo de la modificación genética de plantas. Más particularmente, la presente invención se dirige a plantas genéticamente modificadas que expresan fenotipos de color deseados.

ARTE PREVIO

[0003] Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se refiere el autor en esta especificación se recogen al final de la descripción.

[0004] La referencia a cualquier arte previo en esta especificación no se toma, y no debe tomarse como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que este arte previo forma parte del conocimiento general común en algún país.

[0005] La industria de flores o plantas ornamentales u hortícolas se esfuerza por desarrollar nuevas y diferentes variedades de flores y/o plantas. Un modo efectivo de crear tales variedades novedosas es por medio de la manipulación del color de la flor. Técnicas clásicas de propagación se han usado con cierto éxito para producir un amplio rango de colores para casi todas las variedades comerciales de flores y/o plantas disponibles en la actualidad. Esta metodología se ha

7

restringido, sin embargo, por las limitaciones de un pool de genes de una especie particular y, por esta razón, es raro que una sola especie tenga todo el espectro de variedades de colores. Por ejemplo, el desarrollo de variedades novedosas en colores de plantas o partes de plantas tales como flores, follaje, frutos y tallos ofrecería una oportunidad significativa, en los mercados tanto de las flores cortadas y ornamentales como hortícolas. En la industria de flores o plantas ornamentales u hortícolas, el desarrollo de novedosas variedades en colores de clavel es de particular interés. Esto incluye no solo flores en diferentes colores sino también anteras y estilos.

[0006] El color de la flor se debe predominantemente a tres tipos de pigmento: flavonoides, carotenoides y betalainas. De los tres, los flavonoides son los más comunes y aportan un rango de colores desde el amarillo, pasando por el rojo al azul. Las moléculas de flavonoides que hacen el principal aporte al color de la flor son las antocianinas, que son derivados glicosilados de cianidina y su derivado metilado peonidina, delphinidina y sus derivados metilados petunidina y malvidina y pelargonidina. Las antocianinas se localizan en la vacuola de las células epidérmicas de los pétalos o la vacuola de las células subepidérmicas de las hojas.

[0007] Los pigmentos flavonoides son metabolitos secundarios de la ruta fenilpropanoide. La ruta biosintética para los pigmentos flavonoides (ruta de los favonoides) está bien establecida (Holton and Cornish, *Plant Cell* 7:1071-1083, 1995; Mol et al, *Trends Plant Sci.* 3:212-217, 1998; Winkel-Shirley, *Plant Physiol.* 126:485-493, 2001a; and Winkel-Shirley, *Plant Physiol.* 127:1399-1404, 2001b, Tanaka and Mason, In *Plant Genetic Engineering*, Singh and Jaiwal (eds) SciTech Publishing Llc, USA, 1:361-385, 2003, Tanaka et al, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80:1-24, 2005, Tanaka and Brugliera, In *Flowering and Its Manipulation*, *Annual Plant Reviews* Ainsworth (ed), Blackwell Publishing, UK, 20:201-239, 2006) y se muestra en Figura 1. Tres reacciones y enzimas se encuentran implicadas en

la conversión de fenilalanina en *p*-cumaroil-CoA, uno de los primeros estratos claves en la ruta de los flavonoides. Las enzimas son fenilalanina amoníaco-liasas (PAL – *phenylalanine ammonia-lyase*), cinnamato 4-hidroxilasa (C4H – *cinnamate 4-hydroxylase*) y 4-cumarato: CoA ligasa (4CL – *4-coumarate: CoA ligase*). El primer paso comprometido en la ruta implica la condensación de tres moléculas de malonil-CoA (provista por la acción de acetil CoA carboxilasa (ACC – *acetyl CoA carboxylase*) sobre la acetil CoA y CO₂) con una molécula de *p*-cumaroil-CoA. Esta reacción está catalizada por la enzima chalcona sintasa (CHS – *chalcone synthase*). El producto de esta reacción, 2',4,4',6', tetrahidroxi-chalcona, se isomeriza por lo general rápidamente por la enzima chalcona flavanona isomerasa (CHI – *chalcone flavanone isomerase*) para producir naringenina. La naringenina se hidroxila posteriormente en la posición 3 del anillo central por la flavanona 3-hidroxilasa (F3H – *flavanone 3-hydroxylase*) para producir dihidrokaempferol (DHK – *dihydrokaempferol*).

[0008] El patrón de hidroxilación del anillo B de DHK juega un papel clave en determinar el color de los pétalos. El anillo B puede hidroxilarse en cualquiera de las posiciones 3', o ambas, las 3' y 5', para producir dihidroquercetina (DHQ – *dihydroquercetin*) o dihidromiricetina (DHM – *dihydromyricetin*), respectivamente. Las dos enzimas claves implicadas en esta parte de la ruta son la flavonoide 3' hidroxilasa (F3'H – *flavonoid 3' hydroxylase*) y la flavonoide 3', 5' hidroxilasa (F3'5'H – *3', 5' hydroxylase*), ambas miembros de la clase citocromo P450 de enzimas.

[0009] La F3'H es una enzima clave en la ruta de los flavonoides que lleva a los pigmentos a base de cianidina, los cuales en muchas especies de plantas aportan el color rojo y rosado de la flor. La F3'5'H lleva a la producción de antocianinas a base de delfinidina, las cuales en muchas especies aportan los colores púrpura, violeta y azul de las flores.

[0010] Se han clonado secuencias nucleotídicas que codifican F3'5'Hs (véase Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU92/00334 incorporada en esta especificación por referencia y Holton *et al*, *Nature*, 366:276-279, 1993 y la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU03/01111 incorporada en esta especificación por referencia). Estas secuencias fueron eficientes en modular la 3', 5' hidroxilación de flavonoides en petunia (véase Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU92/00334 y Holton *et al*, 1993 *supra*), tabaco (véase Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU92/00334), claveles (véase Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU96/00296 incorporada en esta especificación por referencia) y rosas (véase Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU03/01111).

[0011] La producción de las antocianinas en colores de los dihidroflavonoles (DHK, DHQ, DHM), implica dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) que lleva a la producción de las leucoantocianidinas. Las leucoantocianidinas se convierten subsiguientemente en las antocianidinas, pelargonidina, cianidina y delphinidina. Estas moléculas flavonoides son inestables bajo condiciones fisiológicas normales, y la glicosilación en la posición 3, por la acción de glicosiltransferasas, estabiliza la molécula de antocianidina permitiendo en esa forma la acumulación de las antocianinas. En general, las glicosiltransferasas transfieren las fracciones azúcar de azúcares UDP a las moléculas flavonoides y muestran altas especificidades para la posición de glicosilación y especificidades relativamente bajas para los sustratos aceptores (Seitz and Hinderer, Anthocyanins. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Constabel and Vasil (eds.), Academic Press, New York, USA, 5:49-76, 1988). Las antocianinas pueden ocurrir como 3-monósidos, 3-biósidos y 3-triósidos así como 3, 5-diglicósidos y 3,7-diglicósidos asociados con los azúcares glucosa, galactosa, rhamnosa, arabinosa y xilosa (Strack and Wray, In: *The Flavonoides - Advances in Research since 1986*. Harborne, J.B. (ed), Chapman and Hall, London, UK, 1-22, 1993).

[0012] Las glicosiltransferasas implicadas en la estabilización de la molécula de antocianidina incluyen UDP glucosa: flavonoide 3-glicosiltransferasa (3GT – *flavonoid 3-glucosyltransferase*), la cual transfiere una fracción glucosa de la UDP glucosa a la posición 3-O de la molécula de antocianidina para producir antocianidina 3-O-glucósido.

[0013] Existen muchos glicósidos de antocianidina en la forma de derivados acilados. Los grupos acilo que modifican los glicósidos de antocianidina pueden dividirse en dos clases principales basadas en su estructura. Los grupos acilo alifáticos incluyen ácido malónico o succínico y la clase aromática incluye los ácidos hidroxí cinnámicos tales como ácido *p*-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico y los ácidos benzoicos tales como ácido *p*-hidroxibenzoico. Por ejemplo el clavel las antocianinas existen como antocianinas que tienen grupos malilo (Nakayama *et al*, *Phytochemistry*, 55, 937-939, 2000; Fukui *et al*, *Phytochemistry*, 63(1): 15-23, 2003).

[0014] Además de las modificaciones anteriores, el pH de la vacuola o el compartimiento en donde se localizan los pigmentos y la co-pigmentación con otros flavonoides tales como flavonoles y flavonas pueden afectar el color de los pétalos. Los flavonoles y las flavonas pueden acilarse también aromáticamente (Brouillard and Dangles, In: *The Flavonoides - Advances in Research since 1986*. Harborne, J.B. (ed), Chapman and Hall, London, UK, 1-22, 1993).

[0015] Las flores de clavel pueden producir dos tipos de antocianidinas, dependiendo de sus pelargonidina y cianidina genotípicas. En la ausencia de actividad F3'H, las antocianinas derivadas de pelargonidina se produce en forma distinta a como se producen las derivadas de cianidina. Los pigmentos derivados de pelargonidina se acompañan usualmente por kaempferol, un flavonol incoloro. Los pigmentos derivados de cianidina se acompañan usualmente tanto por kaempferol como por quercetina. Los dos, la pelargonidina y el kaempferol se

derivan de DHK; las dos, la cianidina y la quercetina se derivan de DHQ (Figura 1).

[0016] La especificidad del sustrato mostrado por DFR regula las antocianinas que acumula una planta. Las DFRs de la petunia y el cimbidio no reducen la DHK y, por consiguiente, no acumulan pigmentos a base de pelargonidina (Forkmann and Ruhnau, *Z Naturforsch C*. 42c, 1146-1148, 1987, Johnson *et al*, *Plant Journal*, 19, 81-85, 1999). Se presume que muchas especies importantes de la floricultura incluyendo iris, delfinio, ciclamen, genciana, cimbidio, nierembergia no acumulan pigmentos derivados de pelargonidina, debido a la especificidad del sustrato de sus DFRs endógenas (Tanaka and Brugliera, 2006 *supra*).

[0017] En el clavel, la enzima DFR es capaz de metabolizar DHK en leucopelargonidina, el precursor de los pigmentos a base de pelargonidina, dando lugar a los claveles de color anaranjado a rojo ladrillo, y DHQ en leucocianidina, el precursor de los pigmentos a base de cianidina, produciendo claveles rosados a rojos. La DFR del clave les también capaz de convertir DHM en leucodelfinidina (Forkmann and Ruhnau, 1987 *supra*), el precursor de los pigmentos a base de delfinidina. Las líneas de claveles silvestres o derivadas en forma clásica no contienen una enzima F3'5'H y, por consiguiente, no sintetizan DHM.

[0018] La enzima DFR de petunia tiene una especificidad diferente a la de la DFR del clavel. Es capaz de convertir DHQ completamente en leucocianidina, pero no es capaz de convertir DHK en leucopelargonidina (Forkmann and Ruhnau, 1987 *supra*). Se sabe además que en las líneas de petunia que contienen la enzima F3'5'H, la enzima DFR de petunia puede convertir la DHM producida por esta enzima en leucodelfinidina, la cual se modifica aún más dando origen a pigmentos a base de delfinidina, que son predominantemente responsables de las flores de color azul (véase Figura 1). Aún cuando la DFR de petunia es capaz de convertir tanto la DHQ como la DHM, es capaz de convertir DHM mucho más

eficientemente, favoreciendo así la producción de delphinidina (Forkmann and Ruhnau, 1987 *supra*).

[0019] Los claveles son una de las flores cortadas más extensamente cultivadas en el mundo.

[0020] Existen miles de variedades de flores cortadas – actuales y antiguas – de clavel cultivado. Éstas se dividen en tres grupos generales basados en la forma de la planta, el tamaño de la flor y el tipo de la flor. Los tres tipos de flor son estándares, minis y midis. La mayoría de los claveles comercializados caen en dos grupos principales – los estándares y los minis. Los claveles estándar están previstos para cultivo bajo condiciones en las cuales se requiere una sola flor grande por tallo. Se retiran los esquejes laterales y los brotes (un proceso llamado desbotonado) para aumentar el tamaño de la flor terminal. Los minis y/o miniaturas están previstos para cultivo con el fin de producir un gran número de flores más pequeñas por tallo. Únicamente se elimina la flor central, permitiendo que las laterales formen un 'abanico' de tallos.

[0021] Las variedades de mini-clavel son populares en el comercio de las flores, ya que los múltiples brotes de la flor en un solo tallo se adaptan perfectamente a varios tipos de arreglos florales y proporcionan volumen a los ramilletes usados en el segmento del mercado masivo de la industria.

[0022] Las variedades cultivadas estándar y mini dominan la industria de flores cortadas de clavel, con cifras aproximadamente iguales de ventas de cada tipo en los USA. En Japón, las variedades tipo mini representan el 70% de las flores de clavel vendidas por volumen, mientras que en Europa los claveles tipo mini representan aproximadamente el 50% de las flores de clavel comercializadas a través de las subastas holandesas. El comercio de las subastas holandesas es un buen indicativo del consumo a lo ancho de Europa.

[0023] Aunque los claveles estándar y tipo midi se han manipulado genéticamente con éxito para introducir nuevos colores (Tanaka and Brugliera, 2006 *supra*; véase asimismo la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/AU96/00296), esto no se ha aplicado a los miniclaveles. Ha habido una ausencia de color azul en el surtido de colores en clavel, tan sólo recientemente satisfecha mediante la introducción de variedades de clavel tipo estándar, genéticamente modificadas. Sin embargo, las variedades tipo estándar no pueden usarse para ciertos propósitos, tales como ramilletes y arreglos florales en los que se necesita un gran número de flores de clavel más pequeñas, tales como arreglos manuales y pequeños centros de mesa.

[0024] Un miniclavel particular que es especialmente popular en el comercio es la línea de claveles Cerise Westpearl (*Dianthus caryophyllus* cv. Cerise Westpearl). La variedad tiene excelentes características de crecimiento y una resistencia entre moderada y buena a los patógenos fúngicos tales como *Fusarium*. Cerise Westpearl es una alteración morfológica ("**a sport**") de Westpearl. Sin embargo, antes de la llegada de la presente invención, no se hallaban a disposición miniclaves de color púrpura/azul.

[0025] White Unesco es un clavel derivado clásicamente del tipo midi. Es blanco y normalmente no produce antocianinas principalmente porque los pétalos no acumulan transcritos *DFR* de clavel y, por consiguiente, cuando White Unesco se transformó con una *Viola F3'5'H* y un gen *DFR* de petunia, más del 80% de las antocianinas producidas se basaron en delfinidina (véase Solicitud Internacional de Patente PCT/AU96/00296). Aunque este proceso ha sido útil en obtener líneas de clavel con pétalos púrpura/violeta, éste se limita a la identificación de líneas blancas que son mutantes en la capacidad de acumular *DFR* mRNA de clavel en el pétalo o enzimas *DFR* funcionales en los pétalos, pero tienen el resto de la ruta de antocianina intacto, de manera que la DHM producida puede convertirse en antocianinas de diferentes colores, estables. De las 13 líneas analizadas (véase

Solicitud Internacional de Patente PCT/AU96/00296), sólo dos fueron deficientes en DFR de clavel, pero intactas en la capacidad de producir antocianinas. De las dos, únicamente una (White Unesco) resultó en la producción de pétalos púrpura/violeta luego de la introducción de F3'5'H y una DFR de petunia.

[0026] La aplicación de un método similar usando *Viola F3'5'H* y una DFR de petunia transformada en una línea en colores tal como Cerise Westpearl no ha generado productos novedosos en colores significativos.

[0027] Existe una necesidad, por consiguiente, de hallar un medio alternativo de producir flores novedosas en colores púrpura/malva, usando líneas en colores tales como Cerise Westpearl.

SUMARIO

[0028] A todo lo largo de esta especificación, a menos que el contexto exija lo contrario, se entenderá que la palabra "incluyen/comprenden/constan", o variaciones tales como "incluye/comprende/consta" o "que incluye/comprende/consta", implicará la inclusión de un elemento establecido o un entero o grupo de elementos o enteros, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

[0029] Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se indican por un número identificador de secuencia (SEQ ID NO). Los SEQ ID NOs corresponden numéricamente a los identificadores de secuencia <400>1 (SEQ ID NO:1), <400>2 (SEQ ID NO:2), etc.

[0030] Un resumen de los identificadores de secuencia usados a todo lo largo de la presente especificación se provee en la Tabla 1.

[0031] La presente invención provee plantas genéticamente modificadas que exhiben inflorescencia alterada. Más particularmente, la presente invención provee claveles genéticamente modificados y, aún más particularmente, mini-claveles genéticamente modificados que exhiben inflorescencia alterada. La inflorescencia alterada es un color en el rango de rojo-púrpura a azul, tal como color púrpura y malva a azul en el tejido o organelos, incluyendo flores, pétalos, anteras y estilos. En una incorporación, el color se determina usando la carta de colores de la Royal Horticultural Society (RHS), en la que los colores se disponen en el orden de los colores completamente saturados con los colores menos saturados y menos brillantes al lado. Los grupos de colores pasan a través del espectro observable y los colores indicados en esta especificación están generalmente en los grupos rojo-púrpura (RHSCC 58-74), púrpura (RHSCC 75-79), púrpura-violeta (RHSCC 81-82), violeta (RHSCC 83-88), violeta-azul (89-98), azul (RHSCC 99-110) contenido en Abanico 2. Los colores se seleccionan del rango que incluye 61 A, 64A, 71 A, 71C, 72A, 81 A, 86 A y 87 A y colores en o próximos a éste.

[0032] En consecuencia, la presente invención se dirige a una planta genéticamente modificada, incluyendo su progenie, con matices de color púrpura/violeta, que comprende una F3',5'H no nativa, funcional, una DFR funcional en los pétalos y material genético que regula por disminución la expresión de un gen *DFR* nativo de una planta.

[0033] En una incorporación, el material genético consta de secuencias nucleotídicas codificantes y no codificantes, que corresponden a la secuencia *DFR* nativa de la planta (*ds plantDFR*). Esta induce silenciamiento mediado por RNAi de horquilla (hpRNAi) principalmente *vía* silenciamiento génico pos-transcripcional (PTGS – *post-transcriptional gene silencing*). Por "nativo/nativa" se da a entender que una enzima o un gen evolucionaron en una planta, es decir, residen normalmente en esa planta. Una enzima o gen "no nativo/nativa" significa que un gen u otro material genético se introdujeron en una planta o una madre de la

planta por ingeniería genética o prácticas de propagación.

[0034] En una incorporación, la planta es un clavel, tal como un mini-clavel, y la DFR nativa es la DFR de clavel. El material genético es un constructo quimérico indicado como *ds carnDFR*.

[0035] En una incorporación, la planta y su progenie, comprenden además material genético que codifica una S-adenosilmetionina no nativa: antocianina 3', 5' metiltransferasa (3'5' AMT) y/o una flavona sintasa (FNS) no nativa.

[0036] En una incorporación adicional la 3'5' AMT es de *Torenia* (ThMT) y la FNS es de *Torenia* (ThFNS).

[0037] Las plantas modificadas y, en particular, los mini-claveles genéticamente modificados comprenden secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H y por lo menos una enzima DFR y expresan por lo menos una molécula *ds plantDFR*. En la medida en que la presente invención se refiere a claveles, la *ds plantDFR* es *ds carnDFR* y los mini-claveles se encuentran convenientemente en un ancestro genético Cerise Westpearl, incluyendo el progenitor de Cerise Westpearl, tal como Westpearl. Otras variedades cultivadas de clavel, incluidas en la presente invención, son variedades en colores tales como Cinderella, Kortina Chanel, Vega, Artisan, Miledy, Barbara, Dark Rendezvous. Otras plantas contempladas en esta especificación incluyen crisantemos, rosas, gerberas, lisianthus, tulipán, lirio, geranio, petunia, iris, *Torenia*, *Begonia*, *Cyclamen*, *Nierembergia*, *Catharanthus*, *Pelargonium*, orquídea, uva, manzana, *Euphorbia*, *Fuchsia* y otras plantas hortícolas u ornamentales.

[0038] Un aspecto de la presente invención se dirige a una planta genéticamente modificada que exhibe inflorescencia alterada en tejido seleccionado, planta que comprende material genético expresado que codifica por lo menos una enzima

17

F3'5'H y por lo menos una enzima DFR y que expresa material genético que regula por disminución un gen *DFR*. Más particularmente, la presente invención provee una planta genéticamente modificada que exhibe inflorescencia alterada, comprendiendo la planta, o su progenie, material genético expresado que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa material genético que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta. En una incorporación, la planta y su progenie contienen además material genético que codifica una ThMT no nativa. En una incorporación particular, el material genético que regula por disminución el gen *DFR* nativo incluye una secuencia nucleotídica codificante y no codificante correspondiente al gen *DFR* nativo o su mRNA ("*ds plantDFR*"). El término "inflorescencia alterada" en este contexto significa comparada con la inflorescencia de una planta (v.g. planta madre o planta de la misma especie) antes de la manipulación genética. El término "que codifica" incluye la expresión del material genético para producir las enzimas F3'5'H y DFR funcionales.

[0039] Una "molécula *ds plantDFR*" es material genético que comprende fragmentos tanto codificantes como no codificantes de una planta, su secuencia genómica *DFR* nativa o secuencia cDNA o mRNA correspondiente. La *ds plantDFR* se expresa para inducir silenciamiento génico mediado por hpRNAi de un gen *DFR* nativo. En una incorporación particular, la planta es clavel y la molécula *ds plantDFR* es *ds carnDFR*.

[0040] En una incorporación particular, la planta es un mini-clavel.

[0041] Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se dirige a una planta mini-clavel que exhibe inflorescencia alterada en tejido seleccionado, comprendiendo el mini-clavel material genético expresado que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa por lo menos una molécula *ds carnDFR* que regula por disminución

la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0042] Aún otro aspecto de la presente invención se dirige a una planta de mini-clavel Cerise Westpearl genéticamente modificada, o alteración morfológica de la misma, que exhibe tejidos de color púrpura a azul, comprendiendo el clavel secuencias genéticas expresadas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresan por lo menos una molécula *ds carnDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0043] Otro aspecto de la presente invención se dirige a una planta de crisantemo genéticamente modificada, que exhibe tejidos de color púrpura a azul, comprendiendo el crisantemo secuencias genéticas expresadas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresan por lo menos una molécula *ds chrysDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0044] Todavía otro aspecto de la presente invención se dirige a una planta de rosa genéticamente modificada, que exhibe tejidos de color púrpura a azul, comprendiendo la rosa secuencias genéticas expresadas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y por lo menos una molécula *ds roseDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0045] Aún otro aspecto más de la presente invención se dirige a una planta de gerbera genéticamente modificada, que exhibe tejidos de color púrpura a azul, comprendiendo la gerbera secuencias genéticas expresadas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y por lo menos una molécula *ds gerbDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0046] Todavía otro aspecto de la presente invención se dirige a una planta ornamental u hortícola genéticamente modificada, que exhibe tejidos de color púrpura a azul, comprendiendo la planta ornamental u hortícola secuencias genéticas expresadas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa e incorporación de por lo menos una molécula *ds plantDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0047] En una incorporación, la planta y su progenie comprenden además material genético que codifica una ThMT no nativa y/o una ThFNS no nativa. La referencia a "púrpura a azul" incluye malva.

[0048] En una incorporación particular, la presente invención provee un mini-clavel genéticamente modificado, identificado en esta especificación como Cerise Westpearl (CW)/pCGP3366 y su progenie y alteraciones morfológicas. En otra incorporación, la presente invención provee un mini-clavel genéticamente modificado, identificado en esta especificación como Cerise Westpearl (CW)/pCGP3601 y su progenie y alteraciones morfológicas. En todavía otra incorporación, la presente invención provee un mini-clavel genéticamente modificado, identificado en esta especificación como Cerise Westpearl (CW)/pCGP3605 y su progenie y alteraciones morfológicas. Aún en otra incorporación, la presente invención provee un mini-clavel genéticamente modificado, identificado en esta especificación como Cerise Westpearl (CW)/pCGP3616 y su progenie y alteraciones morfológicas. Aún en todavía otra incorporación, la presente invención provee un mini-clavel genéticamente modificado, identificado en esta especificación como Cerise Westpearl (CW)/pCGP3607 y su progenie y alteraciones morfológicas.

[0049] Progenie, material reproductor, flores cortadas, células cultivables de tejido

y células regenerables de las plantas genéticamente modificadas forman parte igualmente de la presente invención.

[0050] La presente invención permite además el uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y material genético que regula por disminución un gen *DFR* nativo de la planta en la obtención de un clavel o sus alteraciones morfológicas, que exhiben inflorescencia alterada incluyendo tejido que tiene un color púrpura a violeta a azul.

[0051] Más particularmente, la presente invención se dirige al uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa e incorporación de por lo menos una molécula *ds carnDFR* en la obtención de una planta genéticamente modificada tal como un mini-clavel incluyendo un clavel Cerise Westpearl o sus alteraciones morfológicas, que exhiben inflorescencia alterada incluyendo tejido que tiene un color púrpura a azul.

[0052] Las enzimas F3'5'H pueden provenir de cualquier fuente. Secuencias nucleotídicas que codifican enzimas F3'5'H de *Viola* sp son particularmente útiles (véase Tabla 1). De manera similar, la secuencia nucleotídica que codifica la enzima DFR puede provenir de cualquier especie tal como, aunque no limitada a, *Petunia* sp (v.g. véase Tabla 1), iris, ciclamen, delfinio, genciana, *Cymbidium*, *nierembergia*. Los fragmentos codificantes y no codificantes que forman la espira de la horquilla de la *ds carnDFR* provienen de clavel. El intrón en la *ds carnDFR* proviene del intrón 1 *DFR-A* de *petunia* (Beld *et al*, *Plant Mol. Biol.* 75:491-502, 1989); no obstante, puede usarse cualquier intrón que sea capaz de ser procesado en clavel. En otra incorporación, no se emplea un intrón.

[0053] Secuencias nucleotídicas apropiadas para F3'5'H de *Viola* sp., una *DFR* de

21

Petunia sp y una *DFR* de *Dianthus* sp se exponen en la Tabla 1.

TABLA 1
Resumen de Identificadores de Secuencia

SEQ ID NO:	NOMBRE	ESPECIE	TIPO GFSEQ	DESCRIPCIÓN
1	<i>BPF3'5'H#40.nt</i>	<i>Viola</i> sp	nucleótido	<i>F3'5'H</i> cDNA
2	<i>BPF3'5'H#40.aa</i>	<i>Viola</i> sp	aminoácido	secuencia de aminoácidos <i>F3'5'H</i> deducida
3	<i>Pet gen DFR.nt</i>	<i>Petunia</i> sp	nucleótido	clon genómico <i>DFR</i>
4	<i>Pet gen DFR.aa</i>	<i>Petunia</i> sp	aminoácido	secuencia de aminoácidos <i>DFR</i> deducida
5	<i>DFRint35S F</i>		nucleótido	cebador
6	<i>DFRint35S R</i>		nucleótido	cebador
7	<i>ds carnDFR F</i>		nucleótido	cebador
8	<i>ds carnDFR R</i>		nucleótido	cebador
9	<i>Carn DFR.nt</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i>	nucleótido	<i>DFR</i> cDNA
10	<i>Carn DFR.aa</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i>	aminoácido	secuencia de aminoácidos <i>DFR</i> deducida
11	<i>ThMT.nt</i>	<i>Torenia</i> sp.	nucleótido	<i>3'5'AMTcDHA</i>
12	<i>ThMT.aa</i>	<i>Torenia</i> sp.	aminoácido	secuencia de aminoácidos <i>3'5' AMT</i> deducida
13	<i>ThFNS.nt</i>	<i>Torenia</i> sp.	nucleótido	<i>FNS</i> cDNA
14	<i>ThFNS.aa</i>	<i>Torenia</i> sp.	aminoácido	secuencia de aminoácidos <i>FNS</i> deducida
15	<i>carnANS 5'</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i>	nucleótido	fragmento de promotor <i>ANS</i> de clavel
16	<i>carnANS 3'</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i>	nucleótido	fragmento de terminador <i>ANS</i> de clavel

17	RoseCHS 5'	Rosa hybrida	nucleótido	fragmento promotor CHS de rosa
----	------------	--------------	------------	-----------------------------------

[0054] BP, black pansy (pensamiento negro); nt, nucleótido; aa, aminoácido; pet, petunia; carn, clavel; ThMT, S-adenosilmetionina: antocianina 3',5' metiltransferasa de torenia; ANS, antocianina sintasa; CHS, chalcona sintasa; 3'5' AMT, S-adenosilmetionina: antocianina 3',5' metiltransferasa; FNS, flavona sintasa; ThFNS, flavona sintasa de torenia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0055] **Figura 1** es una representación esquemática de la ruta de biosíntesis para los pigmentos flavonoides, que muestra la producción de 3-glucósidos de antocianidina que ocurren en la mayoría de las plantas que producen antocianinas. Las enzimas implicadas en la ruta se han indicado en la siguiente forma: PAL = Fenilalanina amoníaco-liasa; C4H = Cinnamato 4-hidroxilasa; 4CL = 4-cumarato:CoA ligasa; CHS = Chalcona sintasa; CHI = Chalcona flavanona isomerasa; F3H = Flavanona 3-hidroxilasa; DFR = Dihidroflavonol-4-reductasa; ANS = Antocianidina sintasa, 3GT = UDP-glucosa: flavonoide 3-O-glucosiltransferasa. Otras abreviaturas incluyen: DHK = dihidrokaempferol, DHQ = dihidroquercetina, DHM = dihidromiricetina.

[0056] **Figura 2** es una representación diagramática del plásmido binario pCGP3360, quimérico. La construcción de pCGP3360 se describe en Ejemplo 1. Se marcan los sitios seleccionados de endonucleasas de restricción. Las abreviaturas incluyen LB = Borde izquierdo del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, RB = Región del borde derecho del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, TetR = complejo del gen de resistencia a la tetraciclina, antibiótico. Remítase a la Tabla 2 para una descripción de los elementos del gen.

[0057] **Figura 3** es una representación diagramática del plásmido binario pCGP3366, quimérico. La construcción de pCGP3366 se describe en Ejemplo 1. Se marcan los sitios seleccionados de endonucleasas de restricción. Las abreviaturas incluyen LB = Borde izquierdo del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, RB = Región del borde derecho del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, TetR = complejo del gen de resistencia a la tetraciclina, antibiótico. En esta Figura "ds *canDFR*" = el casete de expresión CaMV 35S: ds *canDFR*: 35S 3'. Remítase a la Tabla 2 para una descripción de los elementos del gen.

[0058] **Figura 4** es una representación diagramática del plásmido binario pCGP3601, quimérico. La construcción de pCGP3601 se describe en Ejemplo 1. Las abreviaturas incluyen LB = Borde izquierdo del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, RB = Región del borde derecho del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, TetR = complejo del gen de resistencia a la tetraciclina, antibiótico. En esta Figura "ds *canDFR*" = el casete de expresión CaMV 35S: ds *canDFR*: 35S 3'. Remítase a la Tabla 2 para una descripción de los elementos del gen.

[0059] **Figura 5** es una representación diagramática del plásmido binario pCGP3605, quimérico. La construcción de pCGP3605 se describe en Ejemplo 1. Las abreviaturas incluyen LB = Borde izquierdo del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, RB = Región del borde derecho del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, TetR = complejo del gen de resistencia a la tetraciclina, antibiótico. En esta Figura "ds *canDFR*" = el casete de expresión CaMV 35S: ds *canDFR*: 35S 3' y "ThMT" = casete de expresión CaMV 35S: ThMT: 35S 3'. Remítase a la Tabla 2 para una descripción de los elementos del gen.

[0060] **Figura 6** es una representación diagramática del plásmido binario pCGP3616, quimérico. La construcción de pCGP3616 se describe en Ejemplo 1. Las abreviaturas incluyen LB = Borde izquierdo del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, RB = Región del borde derecho del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, TetR =

complejo del gen de resistencia a la tetraciclina, antibiótico. En esta Figura "*ds carnDFR*" = el casete de expresión *CaMV35S: ds carnDFR: 35S 3'*. Remítase a la Tabla 2 para una descripción de los elementos del gen.

[0061] Figura 7 es una representación diagramática del plásmido binario pCGP3607, quimérico. La construcción de pCGP3607 se describe en Ejemplo 1. Las abreviaturas incluyen LB = Borde izquierdo del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, RB = Región del borde derecho del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, TetR = complejo del gen de resistencia a la tetraciclina, antibiótico. En esta Figura "*ds carnDFR*" = el casete de expresión *CaMV 35S: ds carnDFR: 35S 3'* y "*ThFNS*" = casete de expresión *e35S 5':ThFNS: petD8 3'*. Remítase a la Tabla 2 para una descripción de los elementos del gen.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0062] Tal como se emplea en la presente especificación, las formas del singular "uno/una", "un/una" y "el/la" incluyen aspectos del plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una planta" incluye una sola planta, así como dos o más plantas; la referencia a "una antera" incluye una sola antera así como dos o más anteras; la referencia a "la invención" incluye un solo aspecto o múltiples aspectos de una invención; y así sucesivamente.

[0063] La presente invención contempla plantas genéticamente modificadas tales como plantas de clavel y, en particular, mini-claveles, que exhiben inflorescencia alterada. La inflorescencia alterada puede ser en cualquier tejido u organelo incluyendo flores, pétalos, anteras y estilos. La inflorescencia particular contemplada en esta especificación incluye un color en el rango de color rojo-púrpura a azul, tal como un color púrpura a azul incluyendo malva. La determinación del color se mide convenientemente contra la carta de colores de la Royal Horticultural Society (RHS) (RHSCC) e incluye los colores 77A, 77B, N80B,

81 A, 81B, 82A, 82B, 88D y los colores intermedios o próximos a cualquiera de los extremos del rango ya indicado. El término "inflorescencia" no debe interpretarse en sentido estrecho y se refiere a cualesquiera células de colores, tejidos, organelos y sus partes, así como flores y pétalos.

[0064] Así pues, un aspecto de la presente invención se dirige a una planta genéticamente modificada que exhibe inflorescencia alterada en tejido seleccionado, planta que comprende material genético expresado que codifica por lo menos una enzima F3'5'H y por lo menos una enzima DFR y que expresa material genético que regula por disminución un gen *DFR* nativo de la planta. La "planta" incluye una planta madre y su progenie que portan la modificación genética. En particular, la presente invención provee una planta genéticamente modificada que exhibe inflorescencia alterada, comprendiendo la planta o su progenie material genético expresado que codifica por lo menos una enzima flavonoide 3',5' hidroxilasa (F3'5'H) no nativa y por lo menos una enzima dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) no nativa y que expresa material genético que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0065] En una incorporación, la planta y su progenie comprenden además material genético que codifica una S-adenosilmetionina no nativa: antocianina 3', 5' metiltransferasa (ThMT) y/o una flavona sintasa (ThFNS). El material genético que regula por disminución el gen *DFR* nativo de la planta comprende, en una incorporación, secuencias nucleotídicas codificantes y no codificantes correspondientes al gen *DFR* nativo de la planta o mRNA (*ds plantDFR*).

[0066] La molécula *ds plantDFR* es un constructo quimérico de material genético codificante y no codificante del DNA genómico DFR o cDNA correspondiente al gen *DFR* nativo o su mRNA en la planta hospedera. La DFR "nativa" es la DFR residente normalmente en la planta hospedera antes de la manipulación genética. Una enzima no nativa o gen incluye un gen u otro material genético que se ha

introducido en una planta o un progenitor de la planta por ingeniería genética o prácticas de propagación de plantas.

[0067] La molécula *ds plantDFR*, cuando se expresa, regula por disminución *vía* PTGS el gen *DFR* en la planta hospedera. La molécula *ds plantDFR* puede ser de clavel (*ds carnDFR*), crisantemo (*ds chrysDFR*), rosa (*ds roseDFR*), gerbera (*ds gerbDFR*), dianthus (*ds dianDFR*), petunia (*ds petDFR*) o de una planta ornamental u hortícola (*ds plantDFR*). Otras *ds plantDFR*'s pueden provenir de lisianthus, tulipán, lirio, geranio, petunia, iris, *Torenia*, *Begonia*, *Cyclamen*, *Nierembergia*, *Catharanthus*, *Pelargonium*, orquídea, uva, manzana, *Euphorbia* o *Fuchsia*.

[0068] En una incorporación particular, la planta es un clavel. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se dirige a un mini-clavel, que exhibe inflorescencia alterada en tejido seleccionado, comprendiendo el mini-clavel material genético expresado que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa por lo menos una molécula *ds carnDFR*. La *ds carnDFR*, cuando se expresa, regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0069] En una incorporación, la planta y su progenie comprenden además material genético que codifica una ThMT no nativa y/o ThFNS.

[0070] Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención se dirige a un mini-clavel que exhibe inflorescencia alterada en tejido seleccionado, comprendiendo el mini-clavel material genético expresado que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa, por lo menos una enzima DFR no nativa y por lo menos una ThMT no nativa y/o ThFNS y que expresa por lo menos una molécula *ds carnDFR*.

[0071] Aunque la presente invención abarca cualquier mini-clavel, un clavel de la línea Cerise Westpearl es particularmente útil, incluyendo sus alteraciones morfológicas. Alteraciones morfológicas útiles de Cerise Westpearl incluyen Westpearl.

[0072] Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se dirige a una línea de planta de mini-clavel Cerise Westpearl genéticamente modificada o sus alteraciones morfológicas, que exhibe tejidos de color púrpura a azul, comprendiendo el clavel secuencias genéticas expresadas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa por lo menos una molécula *ds camDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0073] Más particularmente, la presente invención provee una línea de planta Cerise Westpearl genéticamente modificada (CW)/pCGP3366 (también denominada como CW/3366 o Cerise Westpearl/3366), que exhibe inflorescencia alterada, comprendiendo la línea una secuencia genética expresada que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa por lo menos una molécula *ds camDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0074] Aún más particularmente, la presente invención provee una línea de planta Cerise Westpearl genéticamente modificada (CW)/pCGP3601 (también denominada como CW/3601 o Cerise Westpearl/3601), que exhibe inflorescencia alterada, comprendiendo la línea una secuencia genética expresada que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa por lo menos una molécula *ds camDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0075] Todavía más particularmente, la presente invención provee una línea de

planta Cerise Westpearl genéticamente modificada (CW)/pCGP3605 (también denominada como CW/3605 o Cerise Westpearl/3605) que exhibe inflorescencia alterada, comprendiendo la línea una secuencia genética expresada que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa por lo menos una molécula *ds carnDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0076] Incluso aún más particularmente, la presente invención provee una línea de planta Cerise Westpearl genéticamente modificada (CW)/pCGP3616 (también denominada como CW/3616 o Cerise Westpearl/3616), que exhibe inflorescencia alterada, comprendiendo la línea una secuencia genética expresada que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa por lo menos una molécula *ds carnDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0077] Todavía más particularmente, la presente invención provee una línea de planta Cerise Westpearl genéticamente modificada (CW)/pCGP3607 (también denominada como CW/3607 o Cerise Westpearl/3607), que exhibe inflorescencia alterada, comprendiendo la línea una secuencia genética expresada que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa por lo menos una molécula *ds carnDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0078] En cada uno de los aspectos ya mencionados, la planta y su progenie pueden contener además material genético que codifica una ThMT no nativa y/o ThFNS.

[0079] Ejemplos de líneas transgénicas Cerise Westpearl incluyen #25958 (FLORIGENE Moonberry (marca registrada)) y la línea #25947 (FLORIGENE Moonpearl (marca registrada)).

[0080] Claveles adicionales genéticamente modificados contemplados en esta especificación incluyen los mini-claveles Westpearl, Kortina Chanel, Vega, Barbara y Artisan y los claveles estándar Cinderella, Dark Rendezvous, Miledy.

[0081] Otras plantas genéticamente modificadas contempladas en esta especificación incluyen crisantemos, rosas, gerberas, lisianthus, tulipán, lirio, geranio, petunia, iris, *Torenia*, *Begonia*, *Cyclamen*, *Nierembergia*, *Catharanthus*, *Pelargonium*, orquídea, uva, manzana, *Euphorbia* o *Fuchsia* y otras plantas ornamentales u hortícolas.

[0082] Otro aspecto de la presente invención se dirige a una planta de crisantemo genéticamente modificada, que exhibe tejidos de color púrpura a azul, comprendiendo el crisantemo secuencias genéticas expresadas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa por lo menos una molécula *ds chrysDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0083] Aún otro aspecto de la presente invención se dirige a una planta de rosa genéticamente modificada, que exhibe tejidos de color púrpura a azul, comprendiendo la rosa secuencias genéticas expresadas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa y que expresa por lo menos una molécula *ds roseDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0084] Todavía otro aspecto de la presente invención se dirige a una planta de gerbera genéticamente modificada que exhibe tejidos de color púrpura a azul, comprendiendo la gerbera secuencias genéticas expresadas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H y por lo menos una enzima DFR y que expresa por lo menos una molécula *ds gerbDFR* que regula por disminución la expresión del gen

DFR nativo de la planta.

[0085] Aún otro aspecto de la presente invención se dirige a una planta ornamental u hortícola genéticamente modificada, que exhibe tejidos de color púrpura a azul, comprendiendo la planta ornamental u hortícola secuencias genéticas expresadas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR y que expresa por lo menos una molécula *ds plantDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.

[0086] En una incorporación, la planta y su progenie contienen además material genético que codifica una ThMT no nativa y/o ThFNS. El término "color púrpura a azul" incluye malva.

[0087] Las *ds plantDFR*, *ds chrysDFR*, *ds roseDFR*, *ds gerbDFR*, *ds petDFR* y *ds dianDFR* comprenden fragmentos genómicos codificantes y no codificantes o cDNA del gen que codifica la DFR de la planta hospedera. La expresión de esta molécula resulta en la regulación por disminución del gen *DFR* nativo en la planta hospedera. Comentarios similares se aplican en relación con la *ds plantDFR*'s de otras plantas hospederas.

[0088] La secuencia genética puede ser un constructo simple que porta las secuencias nucleotídicas que codifican las enzimas F3'5'H y la enzima DFR, o pueden emplearse constructos genéticos múltiples. Adicionalmente, las secuencias genéticas pueden integrarse en el genoma de una célula de la planta o puede mantenerse como un cromosoma artificial extra-cromosómico. Aún más, la generación de un mini-clavel que expresa por lo menos una enzima F3'5'H y por lo menos una enzima DFR y que expresa por lo menos una molécula *ds camDFR* puede generarse por medios recombinantes solos o mediante una combinación de propagación convencional y manipulación de ADN recombinante.

Las secuencias genéticas se "expresan" en el sentido de conectarse operacionalmente a un promotor y otras secuencias reguladoras resultantes en la transcripción y traducción para producir las enzimas F3'5'H y DFR.

[0089] Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención contempla un método para producir una planta genéticamente modificada, tal como un mini-clavel, que exhibe inflorescencia alterada, método que comprende introducir en células regenerables de una planta, tal como una planta de mini-clavel, material genético expresable que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa, e incorporación de por lo menos una molécula *ds camDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta, y regenerar una planta a partir de éste u obtener progenie de la planta regenerada.

[0090] En una incorporación, la planta y su progenie, contienen además material genético que codifica una ThMT no nativa y/o ThFNS.

[0091] Metodologías similares se contemplan en esta especificación para crisantemo, rosa, gerbera y plantas ornamentales.

[0092] La planta puede someterse entonces a varias generaciones de crecimiento o cultivo. En consecuencia, la referencia a un mini-clavel genéticamente modificado incluye su progenie y líneas hermanas del mismo, así como sus alteraciones morfológicas.

[0093] Otro aspecto de la presente invención provee un método para producir una planta genéticamente modificada, tal como una línea de mini-clavel, que exhibe inflorescencia alterada, método que comprende seleccionar una planta, tal como un mini-clavel, que contiene material genético expresable que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR, e

incorporación de por lo menos una molécula *ds camDFR* que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta, y cruzar esta planta con otra planta, tal como un mini-clavel, que contiene material genético que codifica la otra de por lo menos una enzima F3'5'H y por lo menos una enzima DFR no nativa, e incorporación de por lo menos una molécula *ds camDFR*, y seleccionar luego plantas F1 o plantas de generación subsiguiente que expresen el material genético.

[0094] En una incorporación, la planta y su progenie contienen además material genético que codifica una ThMT no nativa y/o ThFNS.

[0095] Secuencias nucleotídicas que codifican enzimas F3'5'H y DFR no nativas, relativas a la planta hospedera pueden provenir de cualquier fuente incluyendo *Viola* sp, *Petunia* sp, *Salvia* sp, *Lisianthus* sp, *Gentiana* sp, *Sollya* sp, *Clitoria* sp, *Kennedia* sp, *Campanula* sp, *Lavandula* sp, *Verbena* sp, *Torenia* sp, *Delphinium* sp, *Solanum* sp, *Cineraria* sp, *Vitis* sp, *Babiana stricta*, *Pinus* sp, *Picea* sp, *Larix* sp, *Phaseolus* sp, *Vaccinium* sp, *Cyclamen* sp, *Iris* sp, *Pelargonium* sp, *Liparieae*, *Geranium* sp, *Pisum* sp, *Lathyrus* sp, *Catharanthus* sp, *Malvia* sp, *Mucuna* sp, *Vicia* sp, *Saintpaulia* sp, *Lagerstroemia* sp, *Tibouchina* sp, *Plumbago* sp, *Hypocalyptus* sp, *Rhododendron* sp, *Linum* sp, *Macroptilium* sp, *Hibiscus* sp, *Hydrangea* sp, *Cymbidium* sp, *Millettia* sp, *Hedysarum* sp, *Lespedeza* sp, *Asparagus* sp, *Antigonon* sp, *Pisum* sp, *Freesia* sp, *Brunella* sp o *Clarkia* sp, etc. Por ejemplo, en una incorporación, la enzima F3'5'H proviene de *Viola* sp.

[0096] La DFR puede provenir nuevamente de la misma especie de planta o una diferente. Por ejemplo en una incorporación la enzima DFR proviene de petunia. En otra incorporación la DFR proviene de iris.

[0097] Los fragmentos codificantes y no codificantes que forman la espira de horquilla de la *ds camDFR* proviene de clavel (número de accesoión EMBL

Z67983, número de accesoión GenBank gi: 1067126) o el equivalente funcional de crisantemo, rosa, gerbera o planta ornamental. Puesto que el objetivo de la *ds carnDFR* es regular por disminución el gen *DFR* de clavel nativo vía silenciamiento mediado por RNAi, pueden usarse varios fragmentos de la secuencia *DFR* de clavel nativo (véase la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/IB99/00606, Wesley *et al*, *Plant J.*, 27, 581-590, 2001, Ossowski *et al*, *Plant J.*, 53, 674-690, 2008). Por ejemplo, en una incorporación se emplea un fragmento de 300 bp en una dirección codificante y no codificante. El intrón en la *ds carnDFR* proviene del intrón 1 *DFR-A* de petunia 1 (Beld *et al*, *Plant Mol. Biol.* 73:491-502, 1989); no obstante, puede usarse cualquier intrón que sea capaz de procesarse en clavel. En otra incorporación, no se emplea un intrón. Nuevamente, se aplican genéricamente los mismos comentarios para moléculas *ds plantDFR*.

[0098] La presente invención permite el uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima *DFR* no nativa e incorporación de material genético, que regula por disminución un gen *DFR* nativo de la planta en la obtención de un clavel o sus alteraciones morfológicas que exhibe inflorescencia alterada, incluyendo tejido que tiene un color púrpura a violeta a azul.

[0099] La presente invención contempla asimismo el uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima *DFR* no nativa e incorporación de por lo menos una molécula *ds carnDFR* en la obtención de una planta de mini-clavel, tal como un clavel Cerise Westpearl o sus alteraciones morfológicas, que exhibe inflorescencia alterada incluyendo tejido que tiene un color púrpura a azul.

[0100] En otra incorporación, la presente invención contempla el uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima *DFR* no nativa e incorporación de por lo menos una

molécula *ds DFR* (dirigida al silenciamiento del gen *DFR* nativo) en la obtención de una planta genéticamente modificada seleccionada de una rosa, crisantemo, gerbera, tulipán, lirio, orquídea, lisianthus, begonia, torenia, geranio, petunia, nierembergia, pelargonio, iris, impatiens, ciclamen, uva, manzana, *Euphorbia* o *Fuchsia* u otra planta ornamental u hortícola de las mismas, que exhibe inflorescencia alterada incluyendo tejido que tiene un color púrpura a azul.

[0101] En una incorporación, la planta y su progenie contienen además material genético que codifica una ThMT no nativa y/o ThFNS. Puede requerirse que las células de la planta se transformen con dos o más constructos genéticos, cada uno de los cuales porte uno o más de los diferentes genes. El rongo "color púrpura a azul" incluye malva.

[0102] Flores cortadas, células cultivables de tejido, células regenerables, partes de plantas, semillas, material reproductor (incluyendo polen) se encuentran todas abarcadas por la presente invención.

[0103] Como ya se indicó, secuencias nucleotídicas que codifican enzimas F3'5'H y DFR pueden provenir todas de la misma especie de planta o de dos o más especies diferentes. La secuencia nucleotídica F3'5'H de *Viola* sp y una DFR de una *Petunia* sp y clavel son particularmente útiles en la práctica de la presente invención. Las secuencias nucleotídicas que codifican las enzimas F3'5'H y las enzimas DFR y las respectivas secuencias de aminoácidos se definen en la Tabla 1.

[0104] Moléculas de ácido nucleico que codifican F3'5'Hs se proveen igualmente en la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU92/00334 y Holton *et al*, 1993 *supra*. Estas secuencias se han utilizado para modular la hidroxilación 3',5' de flavonoides en petunia (véase la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU92/00334 y Holton *et al*, 1993 *supra*), tabaco (véase la Solicitud

Internacional de Patente No. PCT/AU92/00334) y claveles (véase la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU96/00296). Las secuencias nucleotídicas de F3'5'H de otras especies tales como *Viola*, *Salvia* y *Sollya* se han clonado (véase la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU03/01 111). Cualquiera de estas secuencias puede usarse en combinación con un promotor y/o terminador. La presente invención contempla particularmente F3'5'H codificada por SEQ ID NO:1 y una DFR codificada por SEQ ID NO:3 y una DFR de clavel (Z67983, gi: 1067126) (SEQ ID NO:9) o una secuencia nucleotídica capaz de hibridarse a cualquiera de SEQ ID NOs: 1 o 3 o 9, o una forma complementaria de la misma bajo condiciones de baja o alta astringencia, o que tenga por lo menos alrededor de 70% de identidad con SEQ ID NO:1 o 3 o 9, luego de un alineamiento óptimo.

[0105] Para los propósitos de determinar el nivel de astringencia para definir moléculas de ácido nucleico capaces de hibridarse a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:9 o sus formas complementarias, baja astringencia incluye y abarca desde por lo menos alrededor de 0% a por lo menos alrededor de 15% v/v formamida y desde por lo menos alrededor de 1M a por lo menos alrededor de 2 M sal de hibridación, y por lo menos alrededor de 1 M a por lo menos alrededor de 2 M de sal para condiciones de lavado. Generalmente, la baja astringencia va desde alrededor de 25-30°C a alrededor de 42°C. La temperatura puede alterarse y pueden emplearse temperaturas más altas para reemplazar la inclusión de formamida y/o para producir condiciones alternativas de astringencia. Donde sea necesario pueden aplicarse condiciones alternativas de astringencia, tales como astringencia media, la cual incluye y abarca desde por lo menos alrededor de 16% v/v a por lo menos alrededor de 30% v/v formamida y desde por lo menos alrededor de 0.5 M a por lo menos alrededor de 0.9 M sal para hibridación, y por lo menos alrededor de 0.5 M a por lo menos alrededor de 0.9 M sal para condiciones de lavado, o alta astringencia, la cual incluye y abarca desde por lo menos alrededor de 31% v/v a por lo menos alrededor de 50% v/v formamida y desde por lo menos alrededor de 0.01 M a por lo menos alrededor de 0.15 M sal para

hibridación, y por lo menos alrededor de 0.01 M a por lo menos alrededor de 0.15 M sal para condiciones de lavado. En general, el lavado se lleva a cabo $T_m = 69.3 + 0.41 (G+C)\%$ (Marmur and Doty, *J. Mol. Biol.* 5.109, 1962). No obstante, la T_m de un DNA bicatenario disminuye en 1°C con cada aumento del 1% en el número de pares de bases de apareamiento incorrecto (Bonner and Laskey, *Eur. J. Biochem.* 46:S3, 1974). La formamida es opcional en estas condiciones de hibridación. Niveles particulares de astringencia de lavado incluyen los siguientes: baja astringencia es 6 x amortiguador SSC, 1.0% p/v SDS a 25-42°C; una astringencia moderada es 2 x amortiguador SSC, 1.0% p/v SDS a una temperatura en el rango de 20°C a 65°C; alta astringencia es 0.2 a 2 x amortiguador SSC, 0.1%-1.0% p/v SDS a una temperatura de por lo menos 65°C.

[0106] La referencia a por lo menos 70% de identidad incluye 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100% de identidad. La comparación puede hacerse también en el nivel de similitud de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 2, 4 o 10. Por consiguiente, se contemplan en esta especificación moléculas de ácido nucleico que codifican una enzima F3'5'H o DFR que tiene por lo menos 70% de similitud con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NOs: 2, 4 o 10. Nuevamente, por lo menos 70% de similitud incluye 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100% de similitud o identidad.

[0107] La molécula de ácido nucleico que codifica las enzimas F3'5'H y DFR y la expresión de la molécula *ds carn DFR* incluye uno o más promotores y/o terminadores. En una incorporación, se selecciona un promotor que dirige la expresión de una secuencia nucleotídica de una F3'5'H y/o una DFR en tejido que tiene un pH más alto.

[0108] En una incorporación, la secuencia promotora es nativa a la planta de

clavel hospedera que se va a transformar, o puede derivarse de una fuente alternativa, en la que la región es funcional en la planta hospedera. Otras fuentes incluyen los genes T-DNA de *Agrobacterium Tumefaciens*, tales como los promotores para los genes que codifican enzimas para la biosíntesis de nopalina, octapina, mannopina, u otras opinas; promotores de plantas, tales como promotores de genes que codifican ubiquitina; promotores específicos de tejido (véase, v.g. Patente de los Estados Unidos No. 5,459,252 a Conkling *et al*; WO 91/13992 a Advanced Technologies); promotores de virus de plantas (incluyendo virus específicos del hospedero), o promotores parcial o completamente sintéticos. Existen numerosos promotores que son potencialmente funcionales en plantas de clavel (véase, por ejemplo, Greve, *J. Mol. Appl. Genet.* 7:499-511, 1983; Salomon *et al*, *EMBO, J.* 3:141- 146, 1984; Garfinkel *et al*, *Cell* 27:143-153, 1983; Barker *et al*, *Plant Mol. Biol.* 2:235-350, 1983); incluyendo varios promotores aislados de plantas (tales como el promotor Ubi del gen obi-1 del maíz, véase, v.g. Patente de los Estados Unidos No. 4,962,028) y virus (tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, *CaMV 35S*). En otras incorporaciones el promotor es *AmCHS 5'*, *RoseCHS 5'* *camANS 5'* y/o *petDFR 5'* (de *Pet gen DFR*) con terminadores correspondientes *petD8 3'*, *nos 3'*, *cam ANS 3'* y *petDFR 5'* (de *Pet gen DFR*), respectivamente.

[0109] Las secuencias promotoras pueden incluir secuencias cis-actantes, las cuales regulan la transcripción, en la que la regulación implica, por ejemplo, la represión o inducción química o física (v.g. regulación basada en metabolitos, luz, u otros factores fisicoquímicos; véase, v.g. WO 93/06710, que divulga un promotor que responde a un nemátodo) o regulación basada en diferenciación celular (tal como la asociada con hojas, raíces, semillas o similares en plantas; véase, v.g. Patente de los Estados Unidos No. 5,459,252 que divulga un promotor específico de la raíz).

[0110] Otras secuencias cis-actantes, que pueden emplearse, incluyen

potenciadores transcripcionales y/o traslacionales. Estas regiones potenciadoras son perfectamente conocidas por las personas expertas en el arte, y pueden incluir el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes.

[0111] La(s) molécula(s) de ácido nucleico que codifica(n) por lo menos una enzima F3'5'H y por lo menos una enzima DFR e incorporación de por lo menos una molécula *ds carnDFR*, en combinación con promotores apropiados y/o terminadores se usa/usan para modular la actividad de una molécula flavonoide en un mini-clavel. La referencia en esta especificación a modular el nivel de una molécula basada en delfinidina se refiere a una elevación o reducción en los niveles de hasta 30% o más particularmente de 30-50%, o incluso más particularmente 50-75%, o todavía más particularmente 75% o más por encima o por debajo de los niveles endógenos normales o existentes de actividad.

[0112] El término "inflorescencia", como se emplea en esta especificación, se refiere a la parte de floración de una planta o cualquier sistema de floración de más de una flor que se separa usualmente de las partes vegetativas por un internodo extendido, y normalmente comprende flores individuales, brácteas y pedúnculos, y pedículos. Como ya se indicó, la referencia a una "planta transgénica" puede leerse igualmente como una "planta genéticamente modificada" e incluye una progenie o línea híbrida, derivada en última instancia de una planta transgénica de primera generación.

[0113] La presente invención contempla además el uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa e incorporación de por lo menos una molécula *ds carnDFR* que regula por disminución la expresión de un gen *DFR* nativo en la obtención de un mini-clavel, tal como un clavel Cerise Westpearl o sus alteraciones morfológicas que exhibe inflorescencia alterada incluyendo tejido que tiene un color púrpura a azul.

[0114] La presente invención contempla igualmente el uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa e incorporación de por lo menos una molécula *ds chrysDFR* que regula por disminución la expresión de un gen *DFR* nativo en la obtención de una planta de crisantemo o sus alteraciones morfológicas, que exhibe inflorescencia alterada incluyendo tejido que tiene un color púrpura a azul.

[0115] La presente invención contempla asimismo el uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa e incorporación de por lo menos una molécula *ds roseDFR* que regula por disminución la expresión de un gen *DFR* nativo en la obtención de una planta de rosa y sus alteraciones morfológicas, que exhibe inflorescencia alterada incluyendo tejido que tiene un color púrpura a azul.

[0116] La presente invención contempla además el uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa e incorporación de por lo menos una molécula *ds gerbDFR* que regula por disminución la expresión de un gen *DFR* nativo en la obtención de una planta de gerbera o sus alteraciones morfológicas, que exhibe inflorescencia alterada incluyendo tejido que tiene un color púrpura a azul.

[0117] La presente invención contempla también el uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa e incorporación de por lo menos una molécula *ds plantDFR* que regula por disminución la expresión de un gen *DFR* nativo en la obtención de una planta, que exhibe inflorescencia alterada incluyendo tejido que tiene un color púrpura a azul.

[0118] En una incorporación, la planta y su progenie contienen además material

40

genético que codifica una ThMT no nativa y/o ThFNS. El material genético puede contener un solo constructo o múltiples constructos. El "color púrpura a azul" incluye malva.

[0119] Incorporaciones de uso similar se aplican a plantas distintas de las ya enumeradas.

[0120] Se provee asimismo un modelo comercial de cultivo, modelo que comprende generar una planta de mini-clavel genéticamente modificada, como se describe en esta especificación, proveer plántulas, semillas, células regenerables, células cultivables de tejido u otro material, a un cultivador, generar números comerciales de ventas de plantas, y ofrecer flores cortadas a los minoristas o mayoristas.

[0121] La presente invención se describe además por los siguientes Ejemplos no limitantes. En estos Ejemplos, se emplearon materiales y métodos como se especifica a continuación.

[0122] Los métodos seguidos fueron como se describe en Sambrook *et al*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989 o Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001 o *Plant Molecular Biology Manual* (2nd edition), Gelvin and Schilperoot (eds), Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 1994 o *Plant Molecular Biology Labfax*, Croy (ed), Bios scientific Publishers, Oxford, UK, 1993.

[0123] Los vectores de clonación pBluescript y PCR script se obtuvieron de Stratagene, USA. pCR7 2.1 se obtuvo de Invitrogen, USA.

Transformación con E. coli

[0124] Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas fueron:

DH5 α

supE44, Δ (lacZYA-ArgF)U169, (ϕ 801acZ Δ M15), hsdR17(r_k^- , m_k^+),
recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, deoR. (Hanahan, *J. Mol. Biol.* 166:551, 1983)

XL 1-Blue

supE44, hsdR17(r_k^- , m_k^+), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1,
lac $^-$, [F'proAB, lacI q , lacZ Δ M15, Tn10(tet^R)] (Bullock *et al*, *Biotechniques* 5:376, 1987).

Cepa BL21-CodonPlus-RIL

ompT hsdS(Rb- mB-) dcm+ Tet r gal endA Hte [argU ileY leuW Cam r]
M15 *E. coli* se deriva de *E. coli* K12 y tiene el fenotipo Nal s , Str s , Rif s , Thi $^-$, Ara $^+$,
Gal $^+$, Mtl $^-$, F $^-$, RecA $^+$, Uvr $^+$, Lon $^+$.

[0125] La transformación de las cepas de *E. coli* se llevó a cabo de acuerdo con el método de Inoue *et al*, *Gene* 96:21-28, 1990.

Cepas y transformaciones de *Agrobacterium tumefaciens*

[0126] La cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada fue AGL0 (Lazo *et al*, *Bio/technology* 9:963-967, 1991).

[0127] DNA plasmídico se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 agregando 5 μ g de DNA plasmídico a 100 μ L de células AGL0 competentes preparadas inoculando un cultivo LB de 50 mL (Sambrook *et al*, 1989 *supra*) e incubación durante 16 horas agitando a 28°C. Las células se sedimentaron entonces y se resuspendieron en 0.5 mL de 85% (v/v) 100 mM CaCl $_2$ /15% (v/v)

glicerol. La mezcla *DNA-Agrobacterium* se congeló por incubación en N₂ líquido durante 2 minutos y luego se dejó descongelar por incubación a 37°C durante 5 minutos. El DNA/mezcla bacteriana se puso entonces en hielo durante 10 minutos más. Las células se mezclaron entonces con 1 mL de medio LB (Sambrook *et al*, 1989 *supra*) y se incubaron agitando durante 16 horas a 28°C. Se seleccionaron células de *A. tumefaciens* que portaban el plásmido en placas de agar LB que contenían antibióticos apropiados tales como 50 µg/mL tetraciclina o 100 µg/mL gentamicina. La confirmación del plásmido en *A. tumefaciens* se hizo mediante cartografiado con endonucleasas de restricción de DNA aislado de los transformantes resistentes a los antibióticos.

Ligaduras de DNA

[0128] Se llevaron a cabo ligaduras de DNA empleando el Kit de Ligadura Amersham o el Kit de Ligadura Promega, de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante.

Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA

[0129] Se aislaron fragmentos generalmente en un gel de agarosa al 1% (p/v) y se purificaron usando el Kit de Extracción en Gel QIAEX II (Qiagen) o el Kit Bresaclean (Bresatec, Australia), siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante.

Reparación de extremos protuberantes luego de la digestión con endonucleasas de restricción

[0130] Los extremos protuberantes 5' se repararon usando el fragmento polimerasa I DNA de Klenow, de acuerdo con protocolos estándar (Sambrook *et al*, 1989 *supra*). Los extremos protuberantes 3' se repararon usando

Bacteriophage T4 DNA polimerasa de acuerdo con protocolos estándar (Sambrook *et al*, 1989 *supra*).

Retiro de grupos fosforilo de ácidos nucleicos

[0131] Fosfatasa alcalina de camarón (SAP - *Shrimp Alkaline Phosphatase*) [USB] se usó por lo general para retirar grupos fosforilo de vectores de clonación para impedir la re-circularización, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR - Polymerase Chain Reaction)

[0132] A menos que se especifique lo contrario, las condiciones de la PCR usando DNA plasmídico como molde incluían emplear 2 ng de DNA plasmídico, 100 ng de cada cebador, 2 μ L 10 mM dNTP mix, 5 μ L 10 x amortiguador Taq DNA polimerasa, 0.5 μ L Polimerasa Taq DNA en un volumen total de 50 μ L. Las condiciones de permutación cíclica incluían un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 94°C durante 20 s, 50°C durante 30 s y 72°C durante 1 minuto con un tratamiento final a 72°C durante 10 minutos antes del almacenamiento a 4°C.

[0133] Las PCRs se realizaron en un Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600.

Etiquetado ^{32}P de Sondas de DNA

[0134] Fragmentos de DNA (50 a 100 ng) se marcaron radioactivamente con 50 μ Ci de [α - ^{32}P]-dCTP usando un kit Gigaprime (Geneworks). Se retiró [α - ^{32}P]-dCTP no incorporada mediante cromatografía en columna Sephadex G-50 (Fine) o columnas de cromatografía Microbiospin P-30 Tris (BioRad).

Aislamiento del Plásmido

44

[0135] Se analizaron colonias únicas con respecto a insertos inoculando caldo LB (Sambrook *et al*, 1989 *supra*) con selección apropiada de antibióticos (v.g. 100 µg/mL ampicilina o 10 a 50 Hg/mL tetraciclina, etc.) e incubando el cultivo líquido a 37°C (para *E. coli*) o 29°C (para *A. tumefaciens*) durante ~16 horas agitando simultáneamente. El DNA plasmídico se purificó usando el procedimiento lisis con álcali (Sambrook *et al*, 1989 *supra*) o usando el sistema de purificación de DNA WizardPlus SV minipreps (Promega) o Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen). Una vez se hubo determinado la presencia de un inserto, se prepararon cantidades más grandes de DNA plasmídico de 50 mL de cultivos de un día para otro, usando el procedimiento lisis con álcali (Sambrook *et al*, 1989 *supra*) o QIAfilter Plasmid Midi kit (Qiagen) y siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante.

Análisis de Secuencias de DNA

[0136] El secuenciamiento de DNA se llevó a cabo usando los PRISM (marca registrada) Ready Reaction Dye Primer Cycle Sequencing Kits de Applied Biosystems. Se siguieron los protocolos suministrados por el fabricante. Las reacciones de secuenciamiento en ciclos se realizaron usando un equipo PCR Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 9600). Los programas de secuenciamiento se efectuaron generalmente por the Australian Genome Research Facility en la Universidad de Queensland, St Lucia, Brisbane, Australia y en The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australia.

[0137] Las secuencias se analizaron usando una aplicación MacVector (marca registrada) (versión 9.5.2 y anterior) [MacVector Inc., Cary, North Carolina, USA].

[0138] Las búsquedas de homología contra las bases de datos Genbank, SWISS-PROT y EMBL se llevaron a cabo usando los programas FASTA y TFASTA (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(8):2444-2448, 1988) o los

programas BLAST (Altschul *et al*, *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410, 1990). Las similitudes porcentuales de secuencias se obtuvieron usando el programa LALIGN (Huang and Miller, *Adv. Appl. Math.* 72:373-381, 1991) o el programa ClustalW (Thompson *et al*, *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680, 1994) en la aplicación MacVector (marca registrada) (MacVector Inc, USA) empleando configuraciones predeterminadas.

[0139] Se produjeron múltiples alineamientos de secuencias usando ClustalW (Thompson *et al*, 1994 *supra*) empleando configuraciones predeterminadas.

Transformaciones de plantas

[0140] Las transformaciones de plantas fueron como se describe en la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/US92/02612 incorporada en esta especificación por referencia o la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU96/00296 o Lu *et al*, *Bio/Technology* 9:864-868, 1991. Pueden emplearse asimismo otros métodos.

[0141] Esquejes ("**cuttings**") de *Dianthus caryophyllus* cv. Cerise Westpearl se obtuvieron de Propagation Australia, Queensland, Australia.

Análisis Transgénico

Codificación de colores

[0142] Se usaron las Cartas de Colores de la Royal Horticultural Society, Tercera y/o Quinta Edición (Londres, Reino Unido), 1995 y/o 2007 para proporcionar una descripción del color observado. Estas cartas ofrecen medios alternativos con los cuales describir los fenotipos de color observados.

Los números designados, no obstante, deben tomarse únicamente como guía de los colores percibidos y no deben considerarse como limitando los colores

posibles que pueden obtenerse.

[0143] Los pétalos de clavel constan de 3 zonas: la uña, la corona y el limbo (Glimn-Lacy and Kaufman, *Botany Illustrated, Introduction to Plants, Major Groups, Flowering Plant Families*, 2nd ed, Springer, USA, 2006). En general sólo el limbo del pétalo es coloreado, siendo la uña de color verde y la corona un halo blanco (véase Figura 4). La referencia al color de la inflorescencia/flor/pétalo de un clavel se refiere generalmente al color del limbo del pétalo del clavel.

Análisis cromatográfico

[0144] Se realizó análisis de Cromatografía de Capa Fina (TLC - *Thin Layer Chromatography*) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*), como se describe generalmente en Brugliera *et al*, *Plant J.* 5:81-92, 1994.

[0145] En general, los análisis TLC y HPLC se realizaron en extractos aislados de los limbos de los pétalos.

Extracción de antocianidinas

[0146] Antes del análisis HPLC, las moléculas de antocianina y flavonol presentes en los extractos de los limbos de los pétalos se hidrolizaron en ácido para eliminar las fracciones glicosilo del núcleo de la antocianidina o flavonol. Los estándares de antocianidina y flavonol se usaron para ayudar a identificar los compuestos presentes en los extractos florales.

[0147] Los extractos de los pétalos se prepararon esencialmente como se describe en Fukui *et al*, 2003 *supra*. Los pétalos se agregaron a 6 N HCl (0.2 mL) y se hirvieron a 100°C durante 20 min. Las antocianidinas hidrolizadas se

extrajeron con 0.2 mL de 1-pentanol. El análisis HPLC de las antocianidinas se realizó usando una columna ODS-A312 (15 cm x 6 mm, YMC Co., Ltd, Kyoto, Japón), un caudal de disolvente de 1 mL min⁻¹, y detección con una absorbancia de 600-400 nm en un detector de arreglo de fotodiodos SPD-M20A (Shimadzu Co., Ltd). El sistema disolvente utilizado era el siguiente: ácido acético: metanol: agua = 15: 20:65. Bajo estas condiciones HPLC, el tiempo de retención y $\lambda_{\max}$ de la delfinidina fueron 4.0 min y 534 nm, respectivamente, y estos valores se compararon con los de cloruro de delfinidina auténtica (Funakoshi Co., Ltd, Tokyo, Japón).

[0148] Se identificaron los picos de antocianidina por referencia a estándares conocidos, *a saber*, delfinidina, petunidina, malvidina, cianidina y peonidina.

Fases del desarrollo de la flor

[0149] Se cosecharon flores de clavel en fases de desarrollo tal como se definen a continuación:

- Fase 1: Brote cerrado, pétalos no visibles.
- Fase 2: Brotes de la flor abriéndose: puntas de los pétalos visibles.
- Fase 3: Puntas de casi todos los pétalos expuestas. "Fase Paint-brush".
- Fase 4: Pétalos externos en un ángulo de 45° al tallo.
- Fase 5: Flor completamente abierta.

[0150] Para análisis TLC o HPLC, se recogieron los limbos de los pétalos de flores en la fase 4, que es la fase de máxima acumulación del pigmento.

[0151] Para análisis Northern blot, se recogieron los pétalos de flores en la fase 3, que es la fase de expresión máxima de genes de la ruta flavonoide.

EJEMPLO 1

Preparación de constructos quiméricos del gen F3'5'H

[0152] Un resumen de los promotores, terminadores y fragmentos codificantes usados en la preparación de constructos y las respectivas abreviaturas se enumeran en la Tabla 2.

TABLA 2

Abreviaturas usadas en las preparaciones de constructos

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
CaMV35S	Fragmento de ~0.4 kb que contenía la región promotora del gen del Virus del Mosaico de la Coliflor 35S (CaMV 35 S) - (Franck et al, Cell 21:285-294, 1980, Guilley et al, Cell, 30:763-773. 1982)
35S 5'	Fragmento del promotor del gen CaMV 35S (Franck et al, 1980 supra) con una secuencia líder 5' no traducida de ~60bp (CabL) del gen de la proteína de unión a/b de clorofila de petunia (gen Cab 22) [Harpster et al, MGG, 212:182-190, 1988]
AmCHS 5'	Fragmento del promotor del gen de la chalcona sintasa (CHS) de Antirrhinum majus que incluye la secuencia 5' de 1.2kb del sitio de iniciación de traducción (Sommer and Saedler, Mol Gen. Gent., 202:429-434, 1986)
BPF3'5'H#40	Viola (Black Pansy) F3'5'H cDNA clon #40 (Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU03/01111 incorporada en esta especificación por referencia) (SEQ ID NO: 1)
35S 3'	Fragmento terminador de ~0.2 kb del gen CaMV 35S (Franck et al, 1980 supra)
Pet gen DFR	Clon genómico DFR-A Petunia de ~5.3kb con su propio

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
	promotor y terminador (SEQ ID NO: 3)
<i>petD8 3'</i>	Región terminadora de ~0.7kb de un gen de proteína de transferencia de fosfolípido (<i>D8</i>) de <i>Petunia hybrida</i> cv. OGB incluye una región no traducida de 150bp de la región transcrita del gen <i>PLTP</i> (Holton, Isolation and characterization of petal-specific genes from <i>Petunia hybrida</i> . PhD Thesis, University of Melbourne, 1992)
<i>SuRB</i>	Gen de la Resistencia a herbicida (clorsulfurón) (codifica Acetolactato Sintasa) con su propio terminador (<i>tSuRB</i>) de <i>Nicotiana tabacum</i> (Lee et al, EMBOJ. 7:1241-1248, 1988)
<i>ds carnDFR</i>	Fragmento de " <i>DFR</i> de clavel de doble hebra (ds)" que alberga un fragmento cDNA <i>DFR</i> de clavel parcial codificante de ~0.3 kb: fragmento del intrón <i>DFR-A petunia</i> de 180bp (Beld et al, 1989 supra): fragmento <i>DFR</i> de clavel parcial no codificante de ~0.3kb, con el objetivo de la formación de una molécula RNA de doble hebra (espira de horquilla) para inducir silenciamiento mediado por RNAi de la <i>DFR</i> nativa de clavel. La secuencia de un clon <i>DFR</i> completo de clavel (Z67983, gi: 1067126) se muestra en SEQ ID NO: 9.
<i>ThMT</i>	Clon cDNA de ~1.0 kb correspondiente a S-adenosilmetionina: antocianina 3'5' metiltransferasa de torenia (Solicitud de Internacional de Patente No. PCT/AU03/00079 incorporada en esta especificación por referencia) (SEQ ID NO: 11)
<i>ThFNS</i>	Clon cDNA de 1.7 kb correspondiente a flavona sintasa de torenia (Akashi et al., Plant Cell Physiol. 40 (11): 1182-1186, 1999, Solicitud Internacional de Patente No. PCT/JP00/00490 incorporada en esta especificación por

50

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
	referencia) (SEQ ID NO: 13)
<i>carnANS5'</i>	Secuencia promotora del gen de antocianidina sintasa (ANS) de <i>Dianthus caryophyllus</i> (Véase la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/GB99/02676 incorporada en esta especificación por referencia) (SEQ ID NO: 15)
<i>carnANS3'</i>	Secuencia terminadora del gen de antocianidina sintasa (ANS) de <i>Dianthus caryophyllus</i> (Véase la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/GB99/02676 incorporada en esta especificación por referencia; (SEQ ID NO: 16)
<i>RoseCHS 5'</i>	Fragmento de ~2.8kb que contiene la región promotora de un gen <i>CHS</i> de <i>Rosa hybrida</i> (véase la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU03/01111 incorporada en esta especificación por referencia) (SEQ ID NO: 17)
<i>e35S 5'</i>	Fragmento de ~0.7 kb que incorpora un promotor <i>CaMV 35S</i> (Mitsuhashi <i>et al. Plant Cell Physiol.</i> 37: 49-59, 1996)

[0153] Cerise Westpearl es un clavel de color cereza (RHSCC 57D). Por lo general acumula pigmentos a base de pelargonidina (~99% del contenido total de antocianina de 1.0mg/g peso fresco del pétalo) y, por consiguiente, carece de actividad F3'H y, por lo tanto, se presume mutante en el gen *F3'H*. Los resultados del análisis HPLC en 2 flores revelaron 1.08mg/g antocianina (99% pelargonidina), 2.9 a 4.6 mg/g flavonoles y 0.3 a 0.6mg/g dihidroflavonoles, que se acumulaban en los pétalos de Cerise Westpearl. Cerise Westpearl es una alteración morfológica de la flor de color Rosado Westpearl.

[0154] Con el fin de producir flores novedosas de color púrpura/azul en el ancestro mini-clavel de Cerise Westpearl, se prepararon dos constructos de vector binario utilizando el clon cDNA *F3'5'H* del pensamiento y el gen *DFR* genómico de petunia, con o sin el casete de expresión *ds carnDFR*.

51

[0155] Tabla 3 provee un resumen de los casetes de expresión del gen F3'5'H y DFR quimérico contenidos en constructos de vector primario usados en la transformación de Cerise Westpearl (véase Tabla 2 para una explicación de las abreviaturas).

TABLA 3 Resumen de Constructos Quiméricos

Constructo	ds plantDFR	DFR	F3'5'H	Otro
pCGP3360	ninguno	Pet gen DFR	AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3'	
pCGP3366	CaMV35S: ds carn DFR: 35S 3'	Pet gen DFR	AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3'	
pCGP3601	CaMV35S: ds carn DFR: 35S 3'	Pet gen DFR	AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3'	carnANS 5':ThMT: carnANS 3'
pCGP3605	CaMV35S : ds carn DFR: 35S 3'	Pet gen DFR	AmCHS5': BPF3'5'H#40: petD8 3'	CaMV 35S:ThMT:35S 3'
pCGP3616	CaMV35S: ds carn DFR: 35S 3'	Pet gen DFR	AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3'	RoseCHS 5':ThFNS:nos 3'
pCGP3607	CaMV35S:ds carn DFR: 35S 3'	Pet gen DFR	AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3'	e35S 5':ThFNS:petD8 3'

NB: Todos tienen el gen marcador seleccionable ALS (35S 5': SuRB)
Remítase a la Tabla 2 para una descripción de las abreviaturas y los elementos genéticos.

52

[0156] Los constructos pCGP3601, 3605, 3607, 3616 están todos basados en pCGP3366 y tienen un casete de expresión extra, que es una expresión específica floral o constitutiva del clon cDNA antocianina 3'5' metiltransferasa de torenia (que direcciona la metilación de la delphinidina) [pCGP3601 y 3605] o una expresión específica floral o constitutiva de un clon cDNA flavona sintasa de torenia (que direcciona la producción de los co-pigmentos, flavonas) [pCGP3616 y 3607].

Preparación de los constructos

El vector de transformación pCGP3360 (AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3'; Pet gen DFR; 35S 5': SuRB)

[0157] El vector de transformación pCGP3360 contiene el casete de expresión *AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3'* y el gen *DFR-A* genómico de petunia junto con el gen marcador seleccionable *35S 5': SuRB*.

Construcción del plásmido intermedio, pCGP3356 (AmCHS 5': BPF3'5'H#40: pet D8 3')

[0158] El plásmido pCGP3356 contiene un gen quimérico que consta de *AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 5'* en un esqueleto a pBluescript.

[0159] Un fragmento de ~1.6kb que albergaba el clon cDNA *BPF3'5'H#40* se liberó del plásmido pCGP1961 (véase la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU03/01111), luego de la digestión con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *KpnI*. Los extremos protuberantes se repararon y se purificó el fragmento. El plásmido pCGP725 que contenía *AmCHS 5': petHf1: pet D8 3'* en pBluescript (descrito en la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU03/01111) se digirió con las endonucleasas de restricción *XbaI* y *BamHI* para liberar el vector esqueleto que albergaba las regiones *AmCHS 5'* y *petD8 3'*. Los extremos protuberantes se

repararon y se aisló el fragmento de ~4.9 kb, se purificó y se ligó con el fragmento de extremo romo *BPF3'5'H#40* de pCGP1961 (descrito más arriba). La correcta inserción del clon cDNA *BPF3'5'H#40* en una orientación codificante entre el promotor *Am CHS 5'* y el terminador *pet D8 3'* se estableció por análisis de endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la penicilina. El plásmido resultante se denominó pCGP3356.

Construcción del plásmido intermedio, pCGP3357 (AmCHS 5': BPF3'5'H#40: pet D8 3' in pCGP1988)

[0160] El plásmido pCGP3357 contiene un gen quimérico compuesto de *AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3'* junto con el gen marcador seleccionable *35S 5': SuRB* en el vector pCGP1988 (véase la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU03/01111).

[0161] El plásmido pCGP3356 (ya descrito) se digirió con la endonucleasa de restricción *PstI* para liberar un fragmento de 3.5 kb, que portaba el casete de expresión *AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3'*. La protuberancia resultante 5' se reparó usando DNA Polimerasa I (fragmento de Klenow) de acuerdo con protocolos estándar (Sambrook *et al*, 1989 *supra*). El fragmento se purificó y ligó con extremos *SmaI* del plásmido pCGP1988 (véase la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU03/01111). La inserción correcta del gen *AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3'* en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador seleccionable *35S 5': SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se denominó pCGP3357.

Construcción del plásmido intermedio, pCGP1472 (clon genómico DFR-A de petunia)

54

[0162] Se elaboró una genoteca de *Petunia hybrida* cv. Old Glory Blue DNA en el vector λ 2001 (Holton, 1992 *supra*). Aproximadamente 200.000 pfu se esparcieron en placas NZY, se tomaron muestras en filtros NEN y los filtros se hibridaron con 400.000 cpm/mL de un fragmento cDNA *DFR-A* de petunia 32 P-marcada (descrito en Brugliera *et al*, 1994, *supra*). Se purificaron clones hibridantes, se aisló DNA de cada uno y se cartografiaron mediante digestión con endonucleasas de restricción. Un fragmento *SacI* de 13 kb de uno de estos clones se aisló y se ligó con los extremos *SacI* de pBluescriptII para crear el plásmido pCGP1472. Una cartografía más fina indicó que un fragmento *BglII* de ~5.3 kb contenía todo el gen *DFR-A* de petunia (Beld *et al*, 1989 *supra*).

Construcción del vector de transformación, pCGP3360

[0163] El fragmento de 5.3kb que alojaba el gen *pet gen DFR* se liberó del plásmido pCGP1472 luego de la digestión con la endonucleasa de restricción *BglII*. Los extremos protuberantes se repararon y el fragmento se purificó y ligó con los extremos *Ascl* reparados del plásmido pCGP3357 (ya descrito). La inserción correcta del gen *pet gen DFR* en una orientación en tándem con respecto a los genes *AmCHS* 5': *BPF3'5'H#40*: *petD8* 5' y 35S 5': *SuRB* se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción de DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se denominó pCGP3360 (Figura 2).

El vector de transformación pCGP3366 (*CaMV35S*: *ds carn DFR*: 35S 3'; *Pet gen DFR*; *AmCHS* 5': *BPF3'5'H#O*: *petD8* 3'; 35S 5': *SuRB*)

[0164] El vector de transformación pCGP3366 contiene el casete de expresión *AmCHS* 5': *BPF3'5'H#40*: *petD8* 3' y los genes *DFR-A* (*pet gen DFR*) genómicos de petunia junto con un casete de expresión *CaMV35S*: *ds earn DFR*: 35S 3' y el gen marcador seleccionable 35S 5': *SuRB*.

SS

Construcción del plásmido intermedio pCGP3359

[0165] Se amplificó un fragmento que portaba 180 bp del intrón 1 *DFR-A* de petunia mediante PCR usando el plásmido pCGP1472 (ya descrito) como molde y los siguientes cebadores:

DFRint35S F GCAT CTCGAG GGATCC TCG TGA TCC TGG TAT GTT TTG
XhoI *BamHI*

(SEQIDNO:5)

DFRint35S R GCAT TCTAGA AGATCT CTT CTT GTT CTC TAC AAA ATC
BglII *BamHI*

(SEQ ID NO:6)

[0166] El cebador directo (DFRint35S F) se diseñó para incorporar los sitios de reconocimiento por endonucleasas de restricción *XhoI* and *BamHI* en el extremo 5'. El cebador inverso (DFRint35S R) se diseñó para incorporar los sitios de reconocimiento por endonucleasas de restricción *Xba I* y *BglII* en el extremo 3' del producto de 180 bp que se amplificó. El producto PCR resultante de 180 bp se digirió entonces con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *XbaI* y se ligó con los extremos *XhoI/XbaI* del plásmido pRTppoptcAFP (una fuente de los fragmentos promotor y terminador *CaMV35S*) (Wnendt *et al*, *Curr Genet* 25: 510-523, 1994). La correcta inserción del fragmento del intrón 1 *DFR-A* de petunia entre los fragmentos *CaMV35S* y 35S 3' de pRTppoptcAFP se confirmó mediante análisis con endonucleasas de restricción del ADN plasmídico aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se denominó pCGP3359.

Aislamiento del clon cDNA DFR de clavel de longitud total

56

[0167] El aislamiento de un clon cDNA *DFR* parcial de clavel se ha descrito en la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU96/00296.

[0168] Alrededor de 120.000 pfus de una genoteca cDNA de pétalo de un clavel Kortina Chanel (cuya construcción se describe en la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU97/000124) se cribaron usando los fragmentos ³²P-marcados de un fragmento *DFR* parcial de clavel *EcoRI/XhoI* (véase PCT/AU96/00296 Internacional) como sonda bajo condiciones de lavado de hibridación de alta astringencia. Se seleccionaron alrededor de 20 placas fuertemente hibridantes y se purificaron posteriormente. De éstas, una (*KCDFR#17*) contenía un inserto de 1.3kb y representaba un clon cDNA *DFR* de clavel de longitud total con 51 bp de la secuencia no traducida 5'. El plásmido se denominó pCGP1547.

Construcción del plásmido intermedio pCGP3363 (CaMV35S: DFR parcial de clavel codificante: intrón 1 DFR de petunia:35S 3')

[0169] Se amplificó un fragmento que portaba ~300 bp del clon cDNA *DFR* de clavel mediante PCR usando el plásmido pCGP1547 (ya descrito) como molde y los siguientes cebadores:

ds carnDFR F GCAT TCTAGA CTCGAG CGA GAA TGA GAT GAT AAA ACC
 XbaI *XhoI*

(SEQ ID N0:7)

ds carnDFR R GCAT AGATCT GGATCC GAG ATT GTT TTC TGC TGC G
 BglIII *BamHI*

(SEQIDN0:8)

[0170] El cebador directo (ds carnDFR F) se diseñó para incorporar los sitios de

57

reconocimiento por las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Xho*I en el extremo 5'. El cebador inverso (ds *car*n*DFR* R) se diseñó para incorporar los sitios de reconocimiento por endonucleasas de restricción *Bgl*II y *Bam*HI en el extremo 3' y el producto de ~300 bp se amplificó. El producto PCR resultante de ~300 bp se digirió entonces con las endonucleasas de restricción *Xho*I y *Bam*HI y se ligó con los extremos *Xho*I/*Bam*HI del plásmido pCGP3359 (ya descrito). La correcta inserción del fragmento *DFR* parcial de clavel en una dirección codificante entre el *CaMV*35S y el intrón 1 *DFR* de petunia del plásmido pCGP3359 se confirmó mediante análisis con endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se denominó pCGP3363.

Construcción del plásmido intermedio pCGP3364 (CaMV35S: ds *car*n *DFR*: 35S3')

[0171] El fragmento *DFR* parcial amplificado de clavel descrito más arriba se digirió con las endonucleasas de restricción *Bgl*II y *Xba*I y se ligó con los extremos *Bgl*II/*Xba*I del plásmido pCGP3363 (ya descrito). La correcta inserción del fragmento *DFR* parcial de clavel en una dirección no codificante entre el intrón 1 *DFR* de petunia y los fragmentos 35S 3' del plásmido pCGP3363 se confirmó mediante análisis con endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se denominó pCGP3364.

Construcción del vector de transformación, pCGP3366

[0172] Un fragmento de ~1.4 kb que portaba el casete de expresión *CaMV*35S: *ds car*n *DFR*: 35S 3' se liberó del plásmido pCGP3364 (descrito más arriba), luego de la digestión con la endonucleasa de restricción *Pst*I. El fragmento se purificó y se ligó con los extremos *Pst*I del plásmido pCGP3360 (descrito más arriba) (Figura

58

2). La correcta inserción del casete de expresión *CaMV35S: ds carn DFR: 35S 3'* en una orientación en tándem con respecto a los genes *AmCHS 5': BPF3'5'H#40: petD8 3', pet gen DFR* y *35S 5': SuRB* se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se denominó pCGP3366 (Figura 3).

[0173] Los T-DNAs de los vectores de transformación pCGP3360 y pCGP3366 se introdujeron en la línea de mini-clavel *Cerise Westpearl* vía transformación mediada por *Agrobacterium*. Se seleccionaron células transgénicas basándose en su capacidad de crecer y echar raíces en un medio que contenía el herbicida clorsulfurón. Las plántulas transgénicas con raíces se retiraron del medio y se transfirieron a suelo y se cultivaron hasta florecer en invernaderos con control de temperatura en Bundoora, Victoria, Australia.

[0174] Se registró el color de los limbos de los pétalos de las plantas transgénicas al ojo usando la RHSCC, y se empleó análisis HPLC para determinar las antocianidinas en los extractos hidrolizados de los limbos de los pétalos. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

TABLA 4
Resultados del análisis transgénico de pétalos de claveles *Cerise Westpearl* transformados con T-DNAs que contenían casetes de expresión del gen *F3'5'H* y *DFR*

<i>transgenes</i>	pCGP	#tg	% CC	# HPLC	% del (Rango)	Av del	Del mg/g FW
<i>AmCHS 5 ' :BP F3'5'H#40:petD8 3';</i>	3360	38	57%	13	52 a 76%	65%	0.42 a 1.98

<i>Pet gen DFR</i>							
<i>AmCHS 5 :BP F3 '5 'H #40:petD8</i> <i>3';</i> <i>Pet gen DFR;</i> <i>CaMV 35S: ds carnDFR: 35S 3'</i>	3366	47	94%	34	51 a 93%	84%	0.28 a 2.68

- Transgenes = secuencias nucleotídicas *F3'5'H* y *DFR* quiméricas contenidas en el T-DNA
- pCGP = número de identificación del plásmido pCGP del vector de transformación utilizado en el experimento de transformación (remítase a la Tabla 3 para más detalles)
- #tg = número total de líneas de claveles transgénicos producidas
- %CC = el porcentaje del número total de eventos producidos que tuvo un cambio en el color de los pétalos hacia el rango de púrpura
- #HPLC = número de eventos individuales cuyas antocianidinas de extractos hidrolizados de limbos de pétalos se analizaron mediante HPLC. Los pétalos para análisis se seleccionaron basándose en el cambio visible de color del pétalo de rosado al rango de púrpura.
- % del (rango) = el rango en % de delfinidina detectada en los extractos hidrolizados de los pétalos para la población de eventos transgénicos
- Av del = el % promedio de delfinidina detectada en los extractos hidrolizados de los pétalos para la población de eventos transgénicos
- Del mg/g FW = el rango en la cantidad de delfinidina (en mg/g de peso fresco) detectada en los extractos hidrolizados de los pétalos para la población de eventos transgénicos

[0175] Los resultados sugieren que de los dos constructos ensayados (pCGP3360

y pCGP3366), pCGP3366 tuvo como resultado un mayor porcentaje de eventos que produjeron flores con un desplazamiento en el color al rango de púrpura. Además, la delfinidina promedio detectada en los extractos hidrolizados de los pétalos fue más alta en los eventos pCGP3366, comparados con los eventos pCGP3360. Esto se debió presumiblemente a la regulación por disminución de la *DFR* endógena de clavel por el casete ds *car*DFR cassette *vía* silenciamiento mediado por RNAi, que lleva a una competición disminuida entre la *DFR* endógena y la F3'5'H introducida para el sustrato DHK. La *DFR* introducida de petunia (que no es capaz de utilizar DHK) permitió posteriormente la conversión DHM (producto de reacción F3'5'H en DHK) en leucodelfinidina y la actividad por la enzimas de la ruta antocianina endógena resultó en que pigmentos derivados de delfinidina se acumularan en el tejido de los pétalos. Para identificar líneas de mini-clavel que producen pétalos de un color novedoso, se compararon los colores de los limbos de los pétalos con líneas de claveles malva/púrpura ya existentes en el mercado. Éstas incluían las líneas midi-clavel FLORIGENE Moonshadow (marca registrada) [82A, 82B] y FLORIGENE Moondust (76A) y las líneas de clavel estándar FLORIGENE Moonvista (marca registrada) [81A+], FLORIGENE Moonshade (marca registrada) [81 A, 82A], FLORIGENE Moonlite (marca registrada) [77D/82D, 77C, N80B] y FLORIGENE Moonaqua (marca registrada) [84A/B]. Veintidós líneas CW/3366 se seleccionaron inicialmente como líneas novedosas de mini-clavel, mientras que sólo una línea CW/3360 se seleccionó como una línea novedosa de mini-clavel. Experimentación posterior con respecto a la consistencia del color de los pétalos y el número de pétalos redujo el listado a 11 líneas CW/3366 y ninguna línea CW/3360 como líneas novedosas de mini-clavel con potencial para nuevas líneas de producto (Tabla 5).

TABLA 5

Código de colores RHS del limbo del pétalo y niveles de delfinidina detectados en líneas seleccionadas de Cerise Westpearl/3366

NÚMERO DE ACCESIÓN	NÚMERO RHSCC	Niveles de Delfinidina % (mg/g FW)
25930	77A	92% (2.2 mg/g)
25931	77A+	93%(1.7mg/g)
25932	77A+	93%(2.3mg/g)
25946	81B/82B	84% (0.3 mg/g)
25947	77D, 78D	nd
25958	81B, 82A, N80B	81% (0.5 mg/g)
25961	77B, 88D	nd
25965	82A	85% (0.7 mg/g)
25966	81B, 82A	83% (0.4 mg/g)
25973	82b	84% (0.5 mg/g)
25976	81B	84% (0.3 mg/g)
FLORIGENE Moondust	76A	100% (0.035mg/g)
FLORIGENE Moonshadow	82A, 82B	94% (0.35 mg/g)
FLORIGENE Moonshade	81 A, 82A	97% (0.6 mg/g)
FLORIGENE Moonlite	77D/82D, 77C	71% (0.06 mg/g)
FLORIGENE Moonaqua	84A/B	74% (0.07 mg/g)
FLORIGENE Moonvista	81A+	98% (1.8 mg/g)

Número de accesión = número único asignado al evento transgénico individual

Número RHSCC = el código de color de los limbos de los pétalos de las flores de líneas de claveles transgénicos. "+" al lado de un número RHSCC destaca que el color es un tono más oscuro o más intenso del código seleccionado

Niveles de delfinidina = niveles de delfinidina detectados en extractos

hidrolizados de tejido del limbo del pétalo, como se determinaron por HPLC, dados en porcentaje de las antocianidinas totales y mg/g de peso fresco de tejido de pétalos

nd (not done) = no realizado

[0176] Evaluaciones adicionales en campo en Colombia revelaron que las líneas #25958, #25947, #25973, #25965 y #25976 produjeron novedosos colores de flores mini-clavel con características de colores consistentes y estables y excelente crecimiento de las plantas. Dos líneas (#25958 y #25947) se seleccionaron para comercialización. La línea #25958 se denominó posteriormente FLORIGENE Moonberry (marca registrada) y la línea #25947 se denominó FLORIGENE Moonpearl (marca registrada). Las dos se están cultivando en Colombia para producción de flores cortadas alrededor del mundo.

Introducción del factor de transformación pCGP3366 en otras variedades de clavel

[0177] Debido al éxito en obtener altos niveles de delphinidina en la variedad de clavel Cerise Westpearl usando el constructo pCGP3366 (que contenía por lo menos una enzima F3'5'H y por lo menos una enzima DFR e incorporación de por lo menos una molécula *ds camDFR*), se introdujeron los mismos genes en otras variedades cultivadas de claveles en colores tales como, pero no limitadas a, Cinderella, Westpearl, Vega, Artisan, Barbara, Dark Rendezvous, Miledy, Kortina Chanel.

[0178] Las plantas transgénicas se evalúan con respecto al color de la flor descrito más arriba y las líneas con un color novedoso de flor (comparado con los controles) se seleccionan para comercialización.

Uso del vector binario pCGP3 366 como una adición de esqueleto a otros casetes de expresión

[0179] Con el fin de desplazar el color de los pétalos todavía más hacia el espectro azul/púrpura, se agregaron al vector binario pCGP3366 otros genes que modulaban la composición de antocianina o flavonoide. Éstos incluían genes que codificaban actividad S-adenosilmetionina: antocianina 3'5' metiltransferasa (AMT) para modular la producción de antocianinas metiladas tales como la producción de pigmentos de malvidina y petunidina y genes que codificaban la actividad flavona sintasa (FNS) para modular la producción de flavonas en clavel.

Adición de casetes de expresión AMT al constructo binario pCGP3366

[0180] En un intento por producir antocianinas basadas en malvidina (la forma metilada de la delphinidina), se prepararon 2 nuevos vectores de transformación, pCGP3601 y pCGP3605, mediante adición de los casetes de expresión *AMT* al vector de transformación, pCGP3366 (Figura 3). La secuencia *AMT* de torenia (Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU03/00079) se utilizó bajo el control de un fragmento promotor específico floral del gen *ANS* de clavel (*camANS* 5') y un fragmento promotor constitutivo del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV35S*).

El vector de transformación, pCGP3601 (camANS 5': ThMT: camANS 3'; AmCHS 5': BPF3'5'H#40:petD8 3'; Pet gen DFR; CaMV35S 5': ds cam DFR: 35S 3'; 35S 5': SuRB)

[0181] El constructo binario pCGP3601 contiene un casete de expresión *camANS* 5': *ThMT*: *camANS* 3' en el esqueleto del constructo binario pCGP3366 (descrito más arriba) (Figura 3).

**Construcción del plásmido intermedio, pCGP3431 (*canANS* 5':*ThMT*:
canANS 3')**

[0182] Un fragmento de ~1.0kb que portaba el clon cDNA *AMT* de torenia (*ThMT*) (SEQ ID NO: 11) se liberó del plásmido pTMT5 (descrito en la Solicitud Internacional de Patente No.: PCT/JP00/00490) luego de la digestión con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *Asp718*. Se repararon los extremos protuberantes y el fragmento purificado se ligó con los extremos reparados *XbaI/PstI* del plásmido pCGP1275 (descrito en la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU2008/001700 incorporada en esta especificación por referencia). La correcta inserción del fragmento *ThMT* entre un fragmento promotor del gen *ANS* de clavel (*canANS* 5') y un fragmento terminador del gen *ANS* de clavel (*canANS* 3') se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se denominó pCGP3431.

Construcción del vector de transformación, pCGP3601

[0183] Un fragmento de 4.4kb que albergaba el casete de expresión *canANS* 5':*ThMT*:*canANS* 3' se aisló del plásmido pCGP3431 (descrito más arriba) luego de la digestión con la endonucleasa de restricción *Clal*. Los extremos protuberantes se repararon y el fragmento purificado se ligó con los extremos *PmeI* del plásmido pCGP3366 (descrito más arriba) (Figura 3). La correcta inserción del casete de expresión *canANS* 5':*ThMT*:*canANS* 3' en una orientación en tándem con respecto a los genes *AmCHS* 5': *BPF3'5'H#40*: *petD8* 3' *pet* gen *DFR*; *CaMV35S* 5': *ds can DFR*: 35S 3' y 35S 5': *SuRB* se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción del DAN plasmídico aislado de transformantes resistentes a tetraciclina. El plásmido resultante se denominó pCGP3601 (Figura 4).

El vector de transformación, pCGP3605 (CaMV35S: ds ean DFR: 35S 3'; CaMV35S: ThMT: 35S 3'; Pet gen DFR; AmCHS 5': BPF3 '5 'H#40:petD8 3'; 35S 5': SuRB)

[0184] El constructo binario pCGP3605 contiene un casete de expresión CaMV35S: ThMT: 35S 3' en el esqueleto del constructo binario pCGP3366 (descrito más arriba) (Figura 3).

Construcción del plásmido intermedio, pCGP3097 (CaMV35S: ThMT: 35S 3')

[0185] El plásmido pTMT5 (descrito en la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/JP00/00490) se linealizó primeramente luego de la digestión con la endonucleasa de restricción Asp718. Los extremos protuberantes se repararon y luego se liberó un fragmento de ~1.0kb que portaba el clon cDNA AMT de torenia (ThMT) (SEQ ID NO: 11) del plásmido linealizado, luego de la digestión con la endonucleasa de restricción EcoRI. El fragmento se purificó y se ligó con los extremos XbaI (extremos reparados)/EcoRI del plásmido pRTppoptcAFP (una fuente de los fragmentos del promotor CaMV35S y el terminador) (Wnendt et al, 1994, supra). La correcta inserción del fragmento ThMT en una orientación codificante entre los fragmentos del promotor y terminador del gen 35S (CaMV35S y 35S 3' respectivamente) del virus del mosaico de la coliflor se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción del ADN plasmídico aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se denominó pCGP3097.

Construcción del vector de transformación, pCGP3605

[0186] Un fragmento de ~1.6kb que albergaba el casete de expresión CaMV35S: ThMT: 35S 3' se aisló del plásmido pCGP3097 (descrito más arriba) luego de la

digestión con la endonucleasa de restricción *Pst*I. Los extremos protuberantes se repararon y el fragmento purificado se ligó con los extremos *Pme*I del plásmido pCGP3366 (descrito más arriba) (Figura 3). La correcta inserción del casete de expresión *CaMV35S: ThMT: 35S 3'* en una orientación en tándem con respecto a los genes *AmCHS5': BPF3'5'H#40: petD8 3', pet gen DFR; CaMV35S: ds carn DFR: 35S 3' y 35S 5': SuRB* se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se denominó pCGP3605 (Figura 5).

Adición de casetes de expresión FNS al constructo binario pCGP3366

[0187] En un intento por producir flavonas (para actuar como co-pigmentos) y altos niveles de delphinidina en un ancestro Cerise Westpearl, se prepararon 2 vectores más de transformación, pCGP3616 and pCGP3607 agregando casetes de expresión *FNS* al vector de transformación, pCGP3366 (Figura 3). Se usó la secuencia *FNS* de torenia (Solicitud Internacional de Patente No. PCT/JP00/00490) (SEQ ID NO: 13) bajo el control de un fragmento promotor específico floral del gen *CHS* de rosa (*RoseCHS 5'*) y un fragmento promotor constitutivo del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV35S*).

El vector de transformación, pCGP3616 (CaMV35S: ds carn DFR: 35S 3'; RoseCHS 5': ThFNS: nos 3'; Pet gen DFR; AmCHS 5': BPF3 '5 'H#40:petD8 3'; 35S S': SuRB)

[0188] El constructo binario pCGP3616 contiene un casete de expresión *RoseCHS 5': ThFNS: nos 3'* en el esqueleto del constructo binario pCGP3366 (descrito más arriba) (Figura 3).

Construcción del plásmido intermedio, pCGP3123 (RoseCHS 5': ThFNS: nos 3')

[0189] Un fragmento de 3.2kb que portaba el casete de expresión e35S 5': *ThFNS: petD8* 3' se liberó del plásmido del vector binario pSFL535 (descrito en la Solicitud Internacional de Patente WO2008/156206) luego de la digestión con la endonucleasa de restricción *Ascl*. El fragmento se purificó y se ligó con los extremos *Ascl* del plásmido pUCAP+*Ascl* de 2.9kb (el plásmido pUCAP/*Ascl* es un vector de clonación basado en pUC19 con sitios de clonación extra, específicamente un sitio de reconocimiento *Ascl* en uno cualquiera de los extremos del sitio de clonación múltiple). La correcta inserción del casete de expresión e35S 5': *ThFNS: petD8* 3' en el vector de clonación basado en pUC se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se denominó pCGP3123.

Construcción del plásmido intermedio, pCGP3612 (*RoseCHS* 5':*ThFNS: nos* 3')

[0190] Este plásmido pCGP3123 (descrito más arriba) se linealizó luego de la digestión con la endonucleasa de restricción *Bam*HI. Los extremos protuberantes se repararon y un fragmento que portaba el clon cDNA *ThFNS* se liberó entonces, luego de la digestión parcial del plásmido linealizado con la endonucleasa de restricción *Xho*I. El fragmento de 1.7 kb se purificó y se ligó con los extremos *Sma*I/*Xho*I del plásmido pCGP2203 (*Rose CHS* 5': *BPF3'5'H#18: nos* 3' en un esqueleto pBluescript) descrito en la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/AU2008/001694. La correcta inserción del fragmento *ThFNS* entre el promotor *RoseCHS* y el terminador *nos* se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se denominó pCGP3612.

Construcción del vector de transformación, pCGP3616

[0191] Un fragmento de 4.9 kb que albergaba el casete de expresión *RoseCHS* 5': *ThFNS*: *nos* 3' se aisló del plásmido pCGP3612 (descrito más arriba), luego de la digestión con las endonucleasas de restricción *Bgl*II y *Not*I. Los extremos protuberantes se repararon y el fragmento purificado se ligó con los extremos *Pme*I del plásmido pCGP3366 (descrito más arriba) (Figure 3). La correcta inserción del casete de expresión *RoseCHS* 5': *ThFNS*: *nos* 3' en una orientación en tándem con respecto a los genes *AmCHS* 5': *BPF3'5'H#40*: *petD8* 3', *pet* gen *DFR*; *CaMV35S*: *ds carn DFR*: 35S 3' y 35S 5': *SuRB* se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se denominó pCGP3616 (Figura 6).

El vector de transformación, pCGP3607 (*CaMV35S*': *ds carn DFR*: 35S 3'; *e35S* 5': *ThFNS*: *petD8* 3'; *Pet* gen *DFR*; *AmCHS* 5': *BPF3'5'H#40*: *petD8* 3'; 35S 5': *SuRB*)

[0192] El constructo binario pCGP3607 contiene un casete de expresión *e35S* 5': *ThFNS*: *petD8* 3' en el esqueleto del constructo binario pCGP3366 (descrito más arriba) (Figura 3).

Construcción del vector de transformación, pCGP3607

[0193] Un fragmento de 3.2kb que portaba el casete de expresión *e35S* 5': *ThFNS*: *petD8* 3' se liberó del plásmido pCGP3123 (descrito más arriba), luego de la digestión con la endonucleasa de restricción *Asc*I. El fragmento se purificó y se ligó con los extremos *Pme*I del plásmido pCGP3366 (descrito más arriba) (Figura 3). La correcta inserción del casete de expresión *e35S* 5': *ThFNS*: *petD8* 3' en una orientación en tándem con respecto a los genes *AmCHS* 5': *BPF3'5'H#40*: *petD8* 3' *pet* gen *DFR*; *CaMV35S*: *ds carn DFR*: 35S 3' and 35S 5': *SuRB* se estableció

mediante análisis con endonucleasas de restricción del DNA plasmídico aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se denominó pCGP3607 (Figura 7).

[0194] Los T-DNAs de los vectores de transformación pCGP3601 (Figura 4), pCGP3605 (Figura 5), pCGP3607 (Figura 7) y pCGP3616 (Figura 6) se introdujeron en la línea de mini-clavel Cerise Westpearl por transformación mediada por *Agrobacterium*. Se seleccionaron células transgénicas basadas en su capacidad de crecer y producir raíces en un medio que contenía el herbicida clorsulfurón. Las plántulas transgénicas se retiraron del medio y se transfirieron al suelo y se cultivaron en invernaderos con control de temperatura en Bundoora, Victoria, Australia. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

TABLA 6

Un resumen del número de Cerise Westpearl transgénicas que resultó en un desplazamiento en el color de los pétalos hacia el rango púrpura/violeta.

Construto	Adición a pCGP3366	#Tg	CC
pCGP3601	<i>carnANS 5': ThMT: carnANS3'</i>	32	11
pCGP3605	<i>CaMV35S: ThMT: 35S 3'</i>	38	14
pCGP3607	<i>e35S 5': ThFNS:petD8 3'</i>	37	15
pCGP3616	<i>RoseCHS 5': ThFNS: nos 3'</i>	19	2

Construto = número de identificación del plásmido pCGP del vector de transformación usado en el experimento de transformación

Adición a pCGP3366 = casete de expresión extra agregado al esqueleto pCGP3366 (Figura 3) que contenía los transgenes *AmCHS 5':BP F3'5'H #40:petD8 3'; Pet gen DFR;*

70

CaMV 35S: ds carnDFR: 35S 3'

- #Tg = número total de líneas de claveles transgénicos producidas
- CC = "Cambio de Color " – el número de eventos producidos que tuvieron un desplazamiento en el color de los pétalos hacia el rango púrpura

[0195] Las plantas transgénicas se evalúan con respecto al color de la flor, como se describe más arriba, y se seleccionan para comercialización las líneas con color novedoso de la flor (comparadas con los controles).

[0196] Las personas expertas en el arte reconocerán que la invención descrita en esta especificación es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Hay que entender que la invención incluye la totalidad de tales variaciones y modificaciones. La invención incluye igualmente la totalidad de los pasos, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta especificación, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de cualquiera de dos o más de los citados pasos o características.

71

BIBLIOGRAFÍA

Altschul *et al*, *J. Mol. Biol.* 215(3).403-410, 1990

Barker *et al*, *Plant Mol. Biol.* 2:235-350, 1983

Beld *et al*, *.Plant Mol. Biol.* 75:491-502, 1989

Bonner and Laskey, *Eur. J. Biochem.* 46:83, 1974

Brouillard and Dangles, In: *The Flavonoides -Advances in Research since 1986*,
Harborne, (ed), Chapman and Hall, London, UK, 1-22, 1993

Brugliera *et al*, *Plant J.* 5:81-92, 1994

Bullock *et al*, *Biotechniques* 5:376, 1987

Forkmann and Ruhnau, *Naturforsch C.* 42c, 1146-1148, 1987

Franck *et al*, *Cell* 27:285-294, 1980

Fukui *et al*, *Phytochemistry.* 63(1), 15-23, 2003

Garfinkel *et al*, *Cell* 27:143-153, 1983

Glimn-Lacy and Kaufman, *Botany Illustrated, Introduction to Plants, Major Groups*,
Flowering Plant Families, 2nd ed, Springer, USA, 2006

Greve, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:499-511, 1983

Guilley *et al*, *Cell* 30:763-773, 1982

Harpster *et al*, *MGG* 212:182-190, 1988

Holton, Isolation and characterization of petal-specific genes from *Petunia hybrida*.
PhD Thesis, University of Melbourne, 1992

Holton *et al*, *Nature*, 366:276-279, 1993

Holton and Cornish, *Plant Cell* 7:1071-1083, 1995

Huang and Miller, *Adv. Appl. Math.* 72:373-381, 1991

Inoue *et al*, *Gene* 96:23-28, 1990

Katsumoto *et al*, *Plant Cell Physiol.* 48(11), 1589-1600, 2007

Johnson *et al* *Plant Journal*, 19/81-85, 1999

Lazo *et al*, *Bio/technology* 9:963-967, 1991

Lee *et al*, *EMBOJ* 7:1241 -1248, 1988

Lu *et al*, *Bio/Technology* 9:864-868, 1991

Marmur and Doty, *J. Mol. Biol.* 5:109, 1962

Mitsuhashi *et al*. *Plant Cell Physiol.* 37: 49-59, 1996

Mol *et al*, *Trends Plant Sci.* 3:212-217, 1998

Nakayama *et al*, *Phytochemistry*, 55, 937-939, 2000

Ossowski *et al*, *Plant J.*, 53, 674-690, 2008

Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(8):2444-2448, 1988

Plant Molecular Biology Labfax, Croy (ed), Bios scientific Publishers, Oxford, UK, 1993

Plant Molecular Biology Manual (2ⁿ edition), Gelvin and Schilperoot (eds), Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 1994

Salomon *et al*, *EMBO, J.* 3:141- 146, 1984

Sambrook *et al*, *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989

Sambrook and Russell, *Molecular Cloning.A Laboratory Manual* 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001

Seitz and Hinderer, Anthocyanins. *In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Constabel and Vasil (eds.), Academic Press, New York, USA, 5:49-76, 1988

Sommer and Saedler, *Mol. Gen. Genet* 202:429-434, 1986

Strack and Wray, *In:The Flavonoides - Advances in Research since 1986*. Harborne, J.B. (ed), Chapman and Hall, London, UK, 1-22, 1993

74

Tanaka and Mason, In *Plant Genetic Engineering*, Singh and Jaiwal (eds) SciTech Publishing Lie, USA, 7:361-385, 2003,

Tanaka et al, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50:1-24, 2005

Tanaka and Brugliera, In *Flowering and Its Manipulation, Annual Plant Reviews* Ainsworth (ed), Blackwell Publishing, UK, 20:201-239, 2006)

Thompson et al, *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680, 1994

Wnendt et al, *Curr Genet* 25: 510-523, 1994

Wesley et al, *Plant J.*, 27, 581-590, 2001

Winkel-Shirley, *Plant Physiol.* 126:485-493, 2001a

Winkel-Shirley, *Plant Physiol.* 127:1399-1404, 2001b

75

REIVINDICACIONES

1. Una planta genéticamente modificada que exhibe inflorescencia alterada, comprendiendo la citada planta o su progenie material genético expresado que codifica por lo menos una enzima flavonoide 3',5' hidroxilasa (F3'5'H) no nativa y por lo menos una enzima dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) no nativa y que expresa material genético que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta.
2. La planta genéticamente modificada en donde la planta o su progenie contiene además material genético expresado que codifica una S-adenosilmetionina: antocianina 3'5' metiltransferasa (ThMT) no nativa y/o flavona sintasa (ThFNS).
3. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 1 o 2 en donde el material genético que regula por disminución el gen *DFR* nativo son secuencias nucleotídicas codificantes y no codificantes que corresponden al gen *DFR* nativo de la planta (*ds plant DFR*).
4. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 3 en donde la planta es un clavel y la *ds plantDFR* es *ds carnDFR*.
5. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 4 en donde el clavel se encuentra en un ancestro Cerise Westpearl.
6. La planta genéticamente modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la inflorescencia alterada es un color en el rango de púrpura a violeta a malva.

7. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 6 en donde la inflorescencia alterada es malva.
8. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 5 en donde el clavel se encuentra en el ancestro genético del mini-clavel *Dianthus caryophyllus* cv. Cerise Westpearl o una alteración morfológica del mismo.
9. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 5 en donde el clavel tiene el ancestro genético de Vega, Artisan, Cinderella, Westpearl, Barbara, Miledy, Dark Rendezvous, Kortina Chanel.
10. La planta genéticamente modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde la enzima F3'5'H proviene de *Viola* sp.
11. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 10 en donde la enzima F3'5'H es codificada por SEQ ID NO:1, o una secuencia nucleotídica capaz de hibridarse a una forma complementaria de SEQ ID NO:1 bajo condiciones de astringencia media.
12. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 10 o 11 en donde la enzima F3'5'H es codificada por SEQ ID NO: 1.
13. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 1 en donde la DFR proviene de *Petunia* sp.
14. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 13 en donde la DFR se codifica por SEQ ID NO:3 o una secuencia nucleotídica capaz de hibridarse a una forma complementaria de SEQ ID NO:3 bajo condiciones de astringencia media.
15. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 14 en donde la DFR se codifica por SEQ ID NO:3.

77

16. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 3 o una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 en donde la *ds plantDFR* proviene de *Dianthus* sp (*ds dianDFR*).

17. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 16 en donde la *ds plantDFR* incorpora un fragmento o fragmentos de SEQ ID NO:9 o una secuencia nucleotídica capaz de hibridarse a una forma complementaria de SEQ ID NO:9 bajo condiciones de alta astringencia.

18. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 17 en donde la *ds plantDFR* incorpora un fragmento o fragmentos de SEQ ID NO:9.

19. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 5 en donde la planta es Cerise Westpearl/3366.

20. Progenie, material reproductor, flores cortadas, células cultivables de tejido y células regenerables de la planta genéticamente modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

21. Uso de secuencias genéticas que codifican por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa e incorporación de material genético que regula por disminución un gen *DFR* nativo de una planta en la obtención de un clavel, o alteraciones morfológicas del mismo, que exhibe inflorescencia alterada incluyendo tejido que tiene un color púrpura a violeta a azul.

22. Uso de la reivindicación 21 que comprende además el uso de material genético que codifica una ThMT no nativa y/o ThFNS.

23. Uso de la reivindicación 21 o 22 en donde la planta de clavel es un clavel Cerise Westpearl.

24. Uso de la reivindicación 23 en donde el material genético que regula por disminución la expresión del gen *DFR* nativo de la planta contiene secuencias nucleotídicas codificantes y no codificantes correspondientes al gen *DFR* nativo de la planta.

25. Un método para producir un clavel que exhibe inflorescencia alterada, comprendiendo el citado método introducir en células regenerables de una planta de clavel material genético expresable que codifica por lo menos una enzima F3'5'H no nativa y por lo menos una enzima DFR no nativa, e incorporación de material genético que regula por disminución la expresión de un gen *DFR* nativo de la planta, y regenerar a partir de él una planta u obtener progenie de la planta regenerada.

26. Un método para producir una línea de clavel que exhibe inflorescencia alterada, método que comprende seleccionar un mini-clavel que contiene material genético que codifica una de por lo menos una enzima F3'5'H no nativa o por lo menos una enzima DFR no nativa, o incorporación de por lo menos una molécula *ds carnDFR* y cruzar esta planta con otro clavel que contiene material genético que codifica la otra de por lo menos una enzima F3'5'H no nativa o por lo menos una enzima DFR no nativa, o incorporación de por lo menos una molécula *carnDFR*, luego seleccionar plantas F1 o plantas de generación subsiguiente, las cuales expresan el material genético.

27. Un método para producir una línea de clavel que exhibe inflorescencia alterada, comprendiendo el citado método seleccionar un mini-clavel que contiene material genético que codifica una de por lo menos una enzima F3'5'H no nativa o por lo menos una enzima DFR no nativa, o incorporación de por lo menos una molécula *ds carnDFR*, y cruzar esta planta con otro clavel y luego seleccionar plantas F1 o plantas de generación subsiguiente, las cuales expresan el material genético.

29

RESUMEN

La invención se refiere a plantas genéticamente modificadas con inflorescencia alterada. Plantas tales como mini-claveles se transforman con una flavonoide 3', 5' hidroxilasa (F3'5'H) no nativa y una dihidroflavanol-4-reductasa (DFR) en conjunción con un supresor genético de DFR nativa. Preferiblemente la especificidad del sustrato de la DFR nativa es diferente de la DFR no nativa, con el fin de mejorar el color de la inflorescencia.

1 / 7

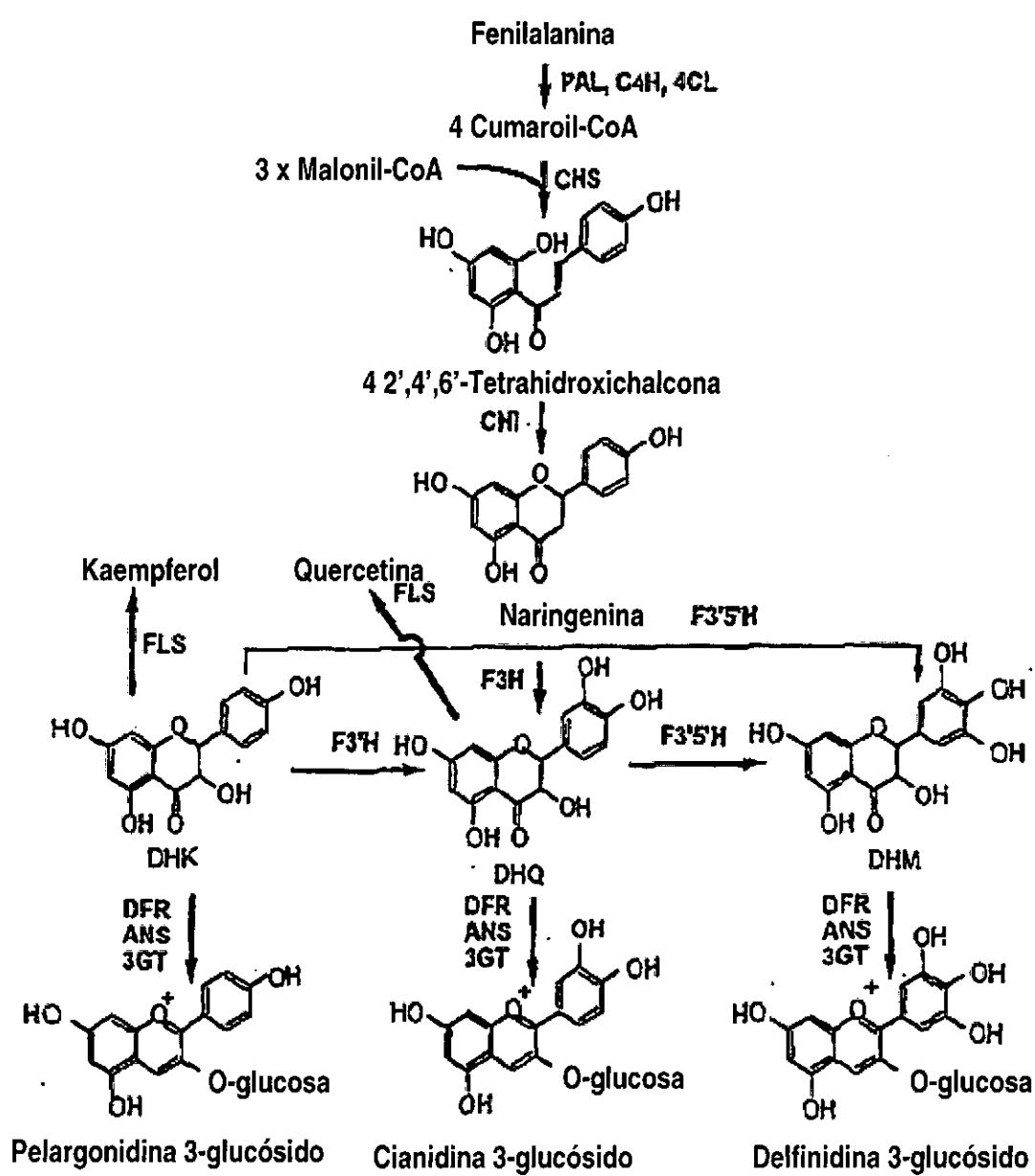


Figura 1

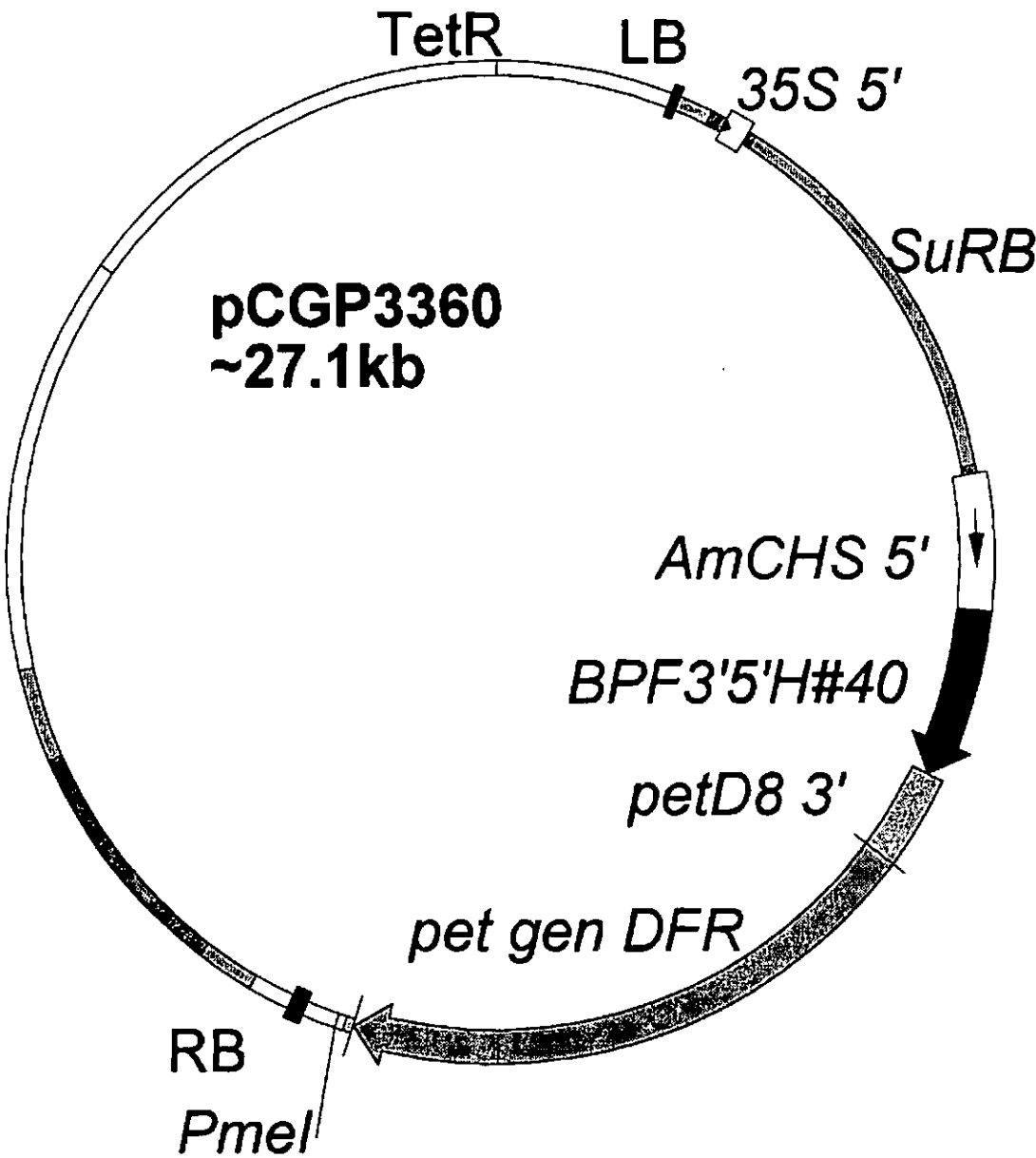


Figura 2

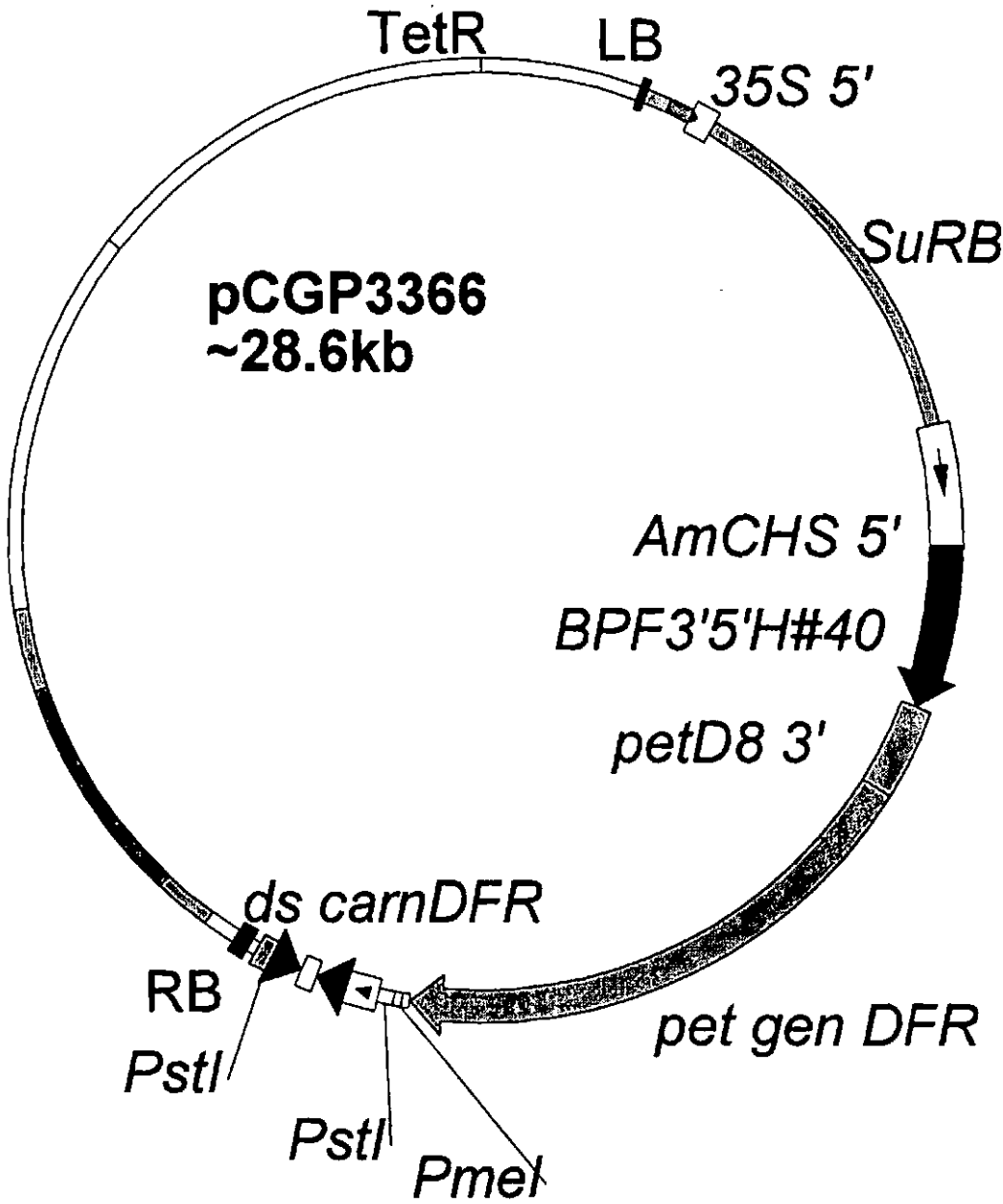


Figura 3

83

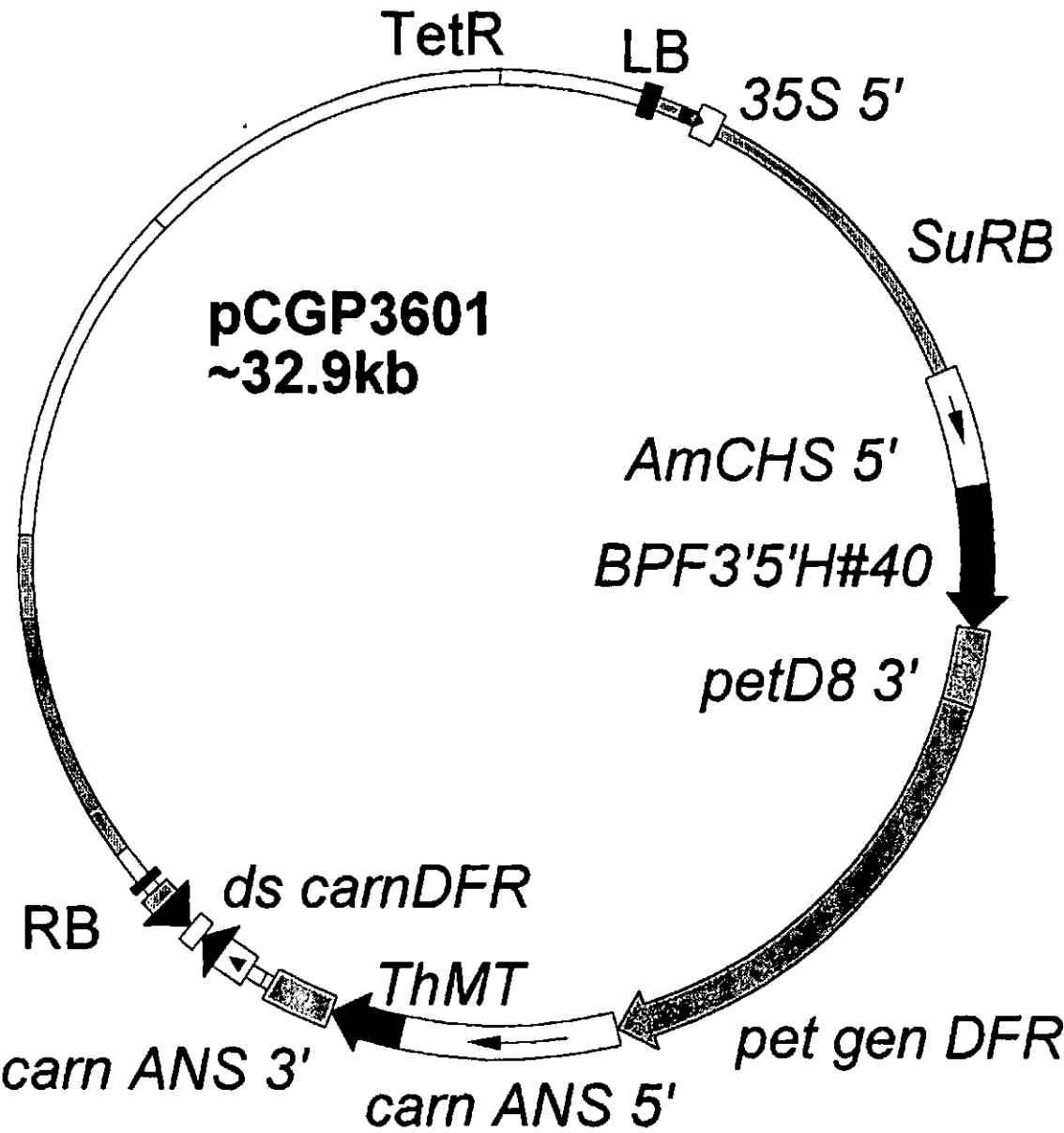


Figura 4

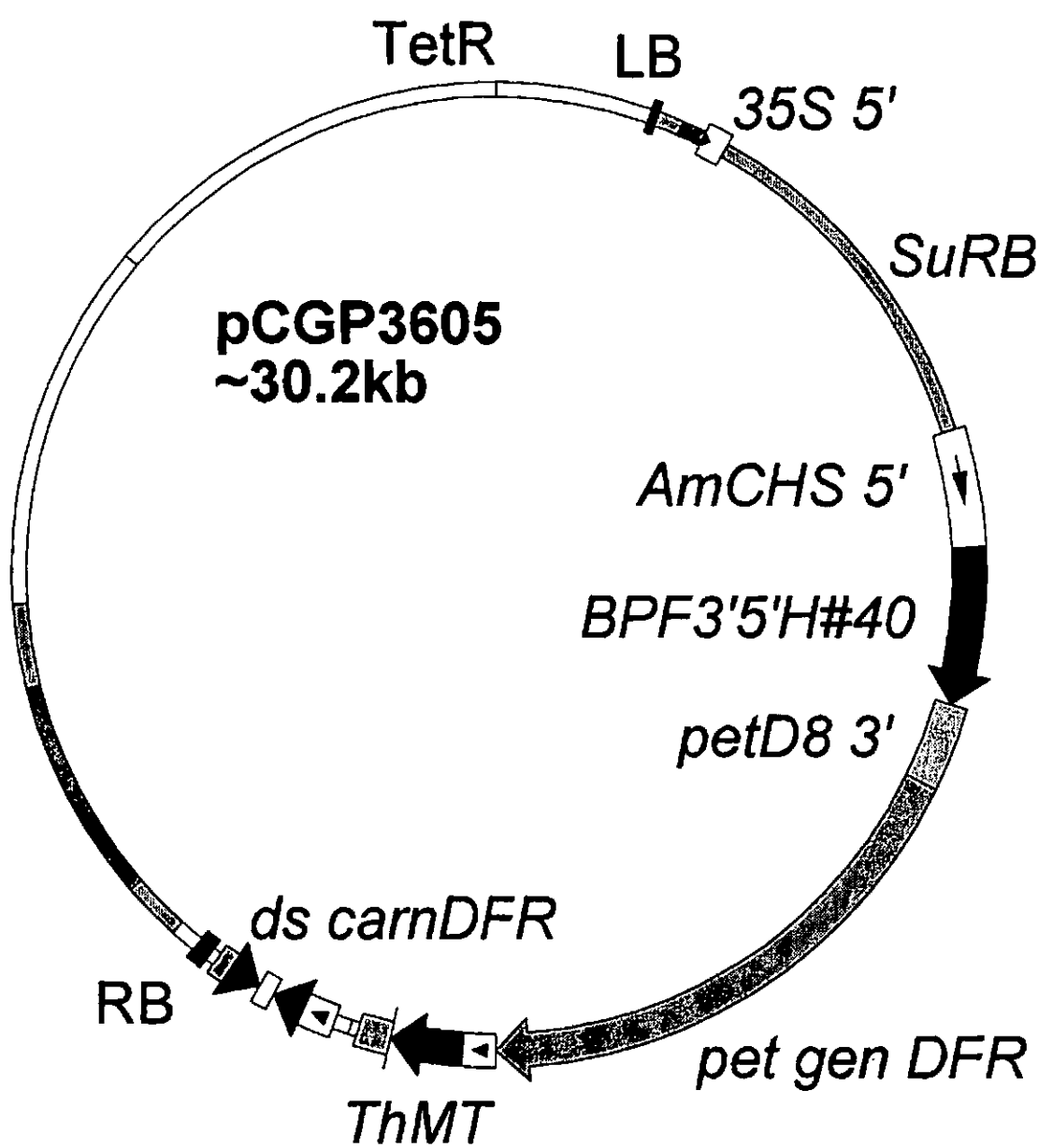


Figura 5

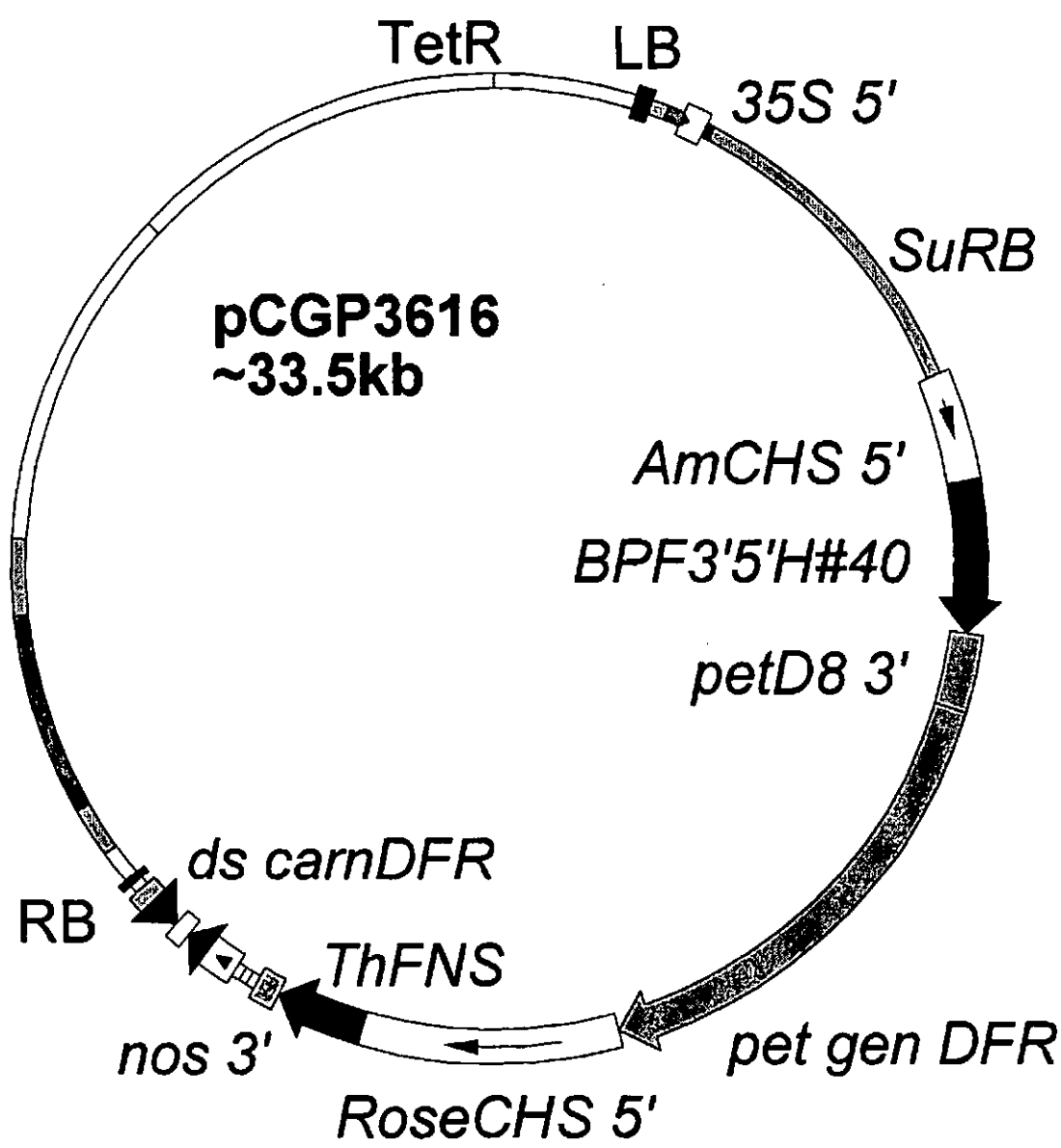


Figura 6

7 / 7

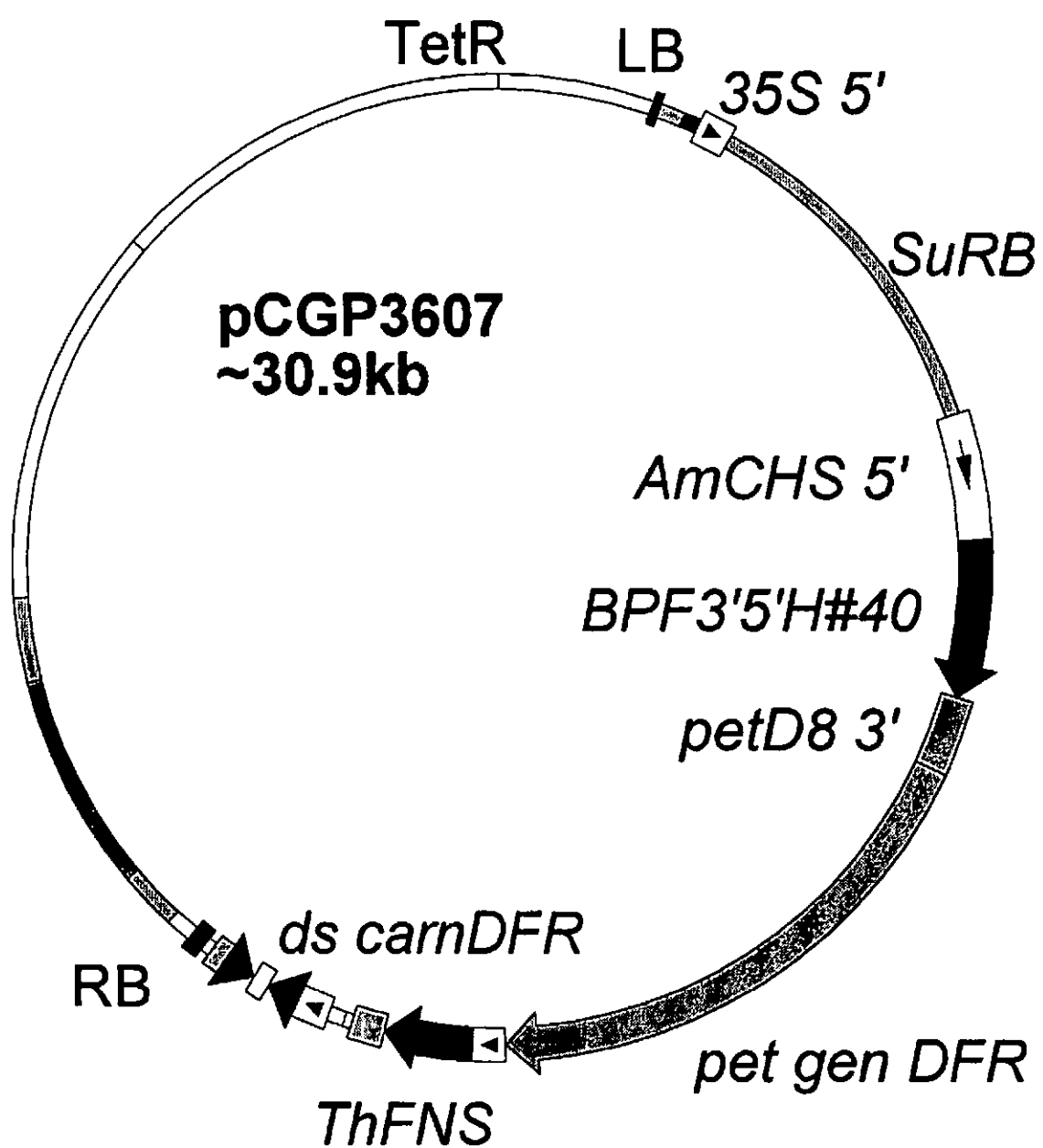


Figura 7

87

PCT/AU2009/001659

FILENAME \p* MERGEFORMAT\PC\W\Perb\NDCC\AAR\2631654_1.DOC-

- 1 -

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PTY LTD
Filippa, BRUGLIERA (US ONLY)

<120> UNA PLANTA

<130> 30895289/EJH

<150> US 61/139,354

<151> 2008-12-19

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1789

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> BPF3'5' H#40.nt - viola sp

<400> 1

ggcacgagga caacatggca attctagtca ccgacttcgt tgtcgcggct ataattttct	60
tgatcactcg gttcttagtt cgttctcttt tcaagaaacc aacccgaccg ctccccccgg	120
gtcctctcgg ttggcccttg gtgggcgccc tccctctcct aggcgccatg cctcacgtcg	180
cactagccaa actcgctaag aagtatggtc cgatcatgca cctaaaaatg ggacagtgcg	240
acatggtggt cgcgtccacc ccgagtcgg ctcgagcctt cctcaaaacg ctagacctca	300
acttctccaa ccgcccaccc aacgcgggcg catcccacct agcgtacggc gcgcaggact	360
tagtcttcgc caagtacggt ccgaggtgga agactttaag aaaattgagc aacctccaca	420
tgctaggcgg gaaggcggtg gatgattggg caaatgtgag ggtcaccgag ctaggccaca	480
tgcttaaagc catgtgcgag gcgagccggt gcggggagcc cgtggtgctg gccgagatgc	540

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2009/001659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.

C12N 9/10 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)
 A01H 5/02 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)
 C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, MEDLINE, BIOSIS, AGRICOLA, HCAPLUS & GENOMEQUEST: SEQ IDs: 1-4 & 7-9; F3'S'H, DFR, PTGS, plants and like terms.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KATSUMOTO, Y. <i>et al.</i> Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. <u>Plant Cell Physiol.</u> November 2007, Vol.48, No.11, pages 1589-1600, ISSN 0032-0781. Abstract; Figures 2 & 4-6; Table 3; p.1590, left-right col., bridging para.1-2; p.1598, right col., para.2; p.1599, left col., para.2	1-27
X	AU 2004264488 B2 (INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PTY LTD) 24 February 2005. Examples 8 & 26-33; p.7, l.16-p.8, l.3; p.8, l.10-14	1, 3-21 & 23-27
X	US 6080920 A (HOLTON) 27 June 2000. Examples 1, 8 & 12; Figures 2-4	1, 3-21 & 23-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C☒ See patent family annex

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
 08 February 2010

Date of mailing of the international search report
 8 MAR 2010

Name and mailing address of the ISA/AU
 AUSTRALIAN PATENT OFFICE
 PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA
 E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au
 Facsimile No. +61 2 6283 7999

Authorized officer
Vishal Desai
 AUSTRALIAN PATENT OFFICE
 (ISO 9001 Quality Certified Service)
 Telephone No. : +61 2 6283 3180

89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2009/001659

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2009/062253 A1 (INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPEMNTS PTY LTD) 22 May 2009. [0044] & claim 4	1

90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2009/001659

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
AU	2004264488	CA	2537065	CN	1836039	EP	1652916
		KR	20060081400	SG	146636	WO	2005017147
US	6080920	AU	56396/96	CA	2202668	EP	0873410
		HU	9802555	NZ	307119	WO	9636716
WO	2009062253	NONE					
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.							
END OF ANNEX							

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/AU2009/001659

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

HUGHES, E, John, L
Davies Collison Cave
1 Nicholson Street
Victoria , Melbourne 3000
AUSTRALIE

Date of mailing (day/month/year) 16 June 2011 (16.06.2011)	
Applicant's or agent's file reference 30895289/EJH	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/AU2009/001659	International filing date (day/month/year) 18 December 2009 (18.12.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address SUNTORY HOLDINGS LIMITED 1-40, Dojimahama 2-chome Kita-ku, Osaka-shi Osaka 5308203 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

The person indicated in box 2 has been added as applicant for all designated States except Japan and the United States of America.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Carrié Christine e-mail pt01.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 01
---	--

Facsimile No. +41 22 338 87 40

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12N 009/010	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) SUNTORY HOLDINGS LIMITED	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 61/139,354	(32) Fecha 19/12/2008	(33) País US
		(72) Inventor(es) FILIPPA BRUGLIERA	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 19/07/2011		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 24/06/2010
	Fecha de presentación de la solicitud: 18/12/2009		N° publicación: WO 2010/069004 A1
	No. de solicitud PCT/AU2009/001659		
(54) Titulo: UNA PLANTA CON INFLORESCENCIA ALTERADA			

Resumen:

La invención se refiere a plantas genéticamente modificadas con inflorescencia alterada. Plantas tales como mini-claveles se transforman con una flavonoide 3', 5' hidroxilasa (F3'5'H) no nativa y una dihidroflavanol-4-reductasa (DFR) en conjunción con un supresor genético de DFR nativa. Preferiblemente la especificidad del sustrato de la DFR nativa es diferente de la DFR no nativa, con el fin de mejorar el color de la inflorescencia.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

93



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0066799

Bogotá D.C., Julio 11 de 2011 - 16:07:49

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411768291	11/07/2011	49.861.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-088087-00000-0000

Fecha: 2011-07-14 11:52:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 96

Covo: 17511-841-003-4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 11 de 2011 - 16:08:07

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

94



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0064511

Bogotá D.C., Julio 01 de 2011 - 16:17:52

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	182169960	01/07/2011	26.530.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5.000.00	5.000.00
				\$5.000.00

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-088087-00000-0000

Fecha: 2011-07-14 11:52:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 96

COCO: 17511-847-003-4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: Info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 1 de 2011 - 16:48:54

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0064512

Bogotá D.C., Julio 01 de 2011 - 16:17:52

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	182169960	01/07/2011	26.530.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5.000.00	5.000.00
				<u>\$5.000.00</u>

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-088087 - 00000-0000

Fecha: 2011-07-14 11:52:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 96

COWO-17511-841-003-4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 1 de 2011 - 16:48:54

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

96



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0066746

Bogotá D.C., Julio 11 de 2011 - 16:07:49

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411768291	11/07/2011	49.861.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1612 TASA ANUAL A#OS 9 a 12 CUATRENIO PARA MANTENIMINETO DE	451.000.00	451.000.00
				\$451.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-088087 - 00000-0000

Fecha: 2011-07-14 11:52:26
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 96

COW 17511-841-003-4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 11 de 2011 - 16:08:05



No. 11-088087- -00000-0000

Fecha: 2011-07-14 11:52:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 96

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
SUNTORY HOLDINGS LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	11 088087
	Solicitud internacional	PCT/US2009/001659
	Fecha inicio fase nacional	19/07/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

13692

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

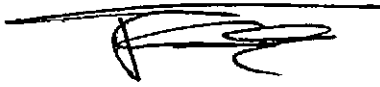
1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

02 SET. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11