

DESCRIPCIÓN

Título de la Invención

CREACIÓN DE CRISANTEMO CON COLOR DE FLOR AZUL

Campo de la invención

[0001]

La presente invención hace referencia a casetes de expresión para la coexpresión del gen 3', 5'-O-glucosiltransferasa de antocianina derivado de clitoria (CtA3'5'GT) y del gen 3', 5'-hidroxilasa flavonoide derivado de campánula (CamF3'5'H) en pétalos de crisantemo, también hace referencia a vectores y plantas de crisantemo transformadas que contienen casetes de expresión, o sus progenies endogámicas o exogámicas, o sus propágulos, cuerpos parciales de plantas (especialmente flores cortadas), formas procesadas (especialmente flores cortadas procesadas), tejidos o células, así como a un método para crear una planta de crisantemo transformada con un color de flor azul.

Antecedentes del arte previo

[0002]

El crisantemo, la rosa, el clavel y el lirio son plantas ornamentales de importancia industrial en todo el mundo. En particular, el crisantemo se utiliza a escala comercial en la industria de plantas ornamentales en todo el mundo, ocupando el segundo lugar después de la rosa, y en Japón es la planta ornamental primaria, constituyendo el 40% de la producción de flores cortadas y el 30% del resultado de producción. Sin embargo, con las principales plantas ornamentales que se mencionan anteriormente, existe un problema en el sentido de que ninguna de las especies relacionadas que pueden hibridarse tienen variedades silvestres con color de flor azul y, por lo tanto, ha sido difícil crear variedades con color de flor azul mediante cruzamiento convencional y mutación. La creación de colores completamente nuevos de flores azules lleva a una nueva demanda de usos aún más amplios de plantas ornamentales, lo que ayuda a aumentar la producción y el consumo. Por lo tanto, se han creado plantas ornamentales con colores de flores azules mediante métodos de ingeniería genética y, en el caso de los claveles y las rosas, han aparecido en el mercado. Sin embargo,

las modificaciones previas del color de la flor que buscaban obtener el color de la flor azul se han limitado al morado (grupo de tonalidad de color de la tabla de colores RHS: grupo morado) o al violeta (grupo violeta-morado, grupo violeta), mientras que no ha sido posible crear plantas ornamentales azules con colores de flor violeta-azul (grupo violeta-azul) o azul (grupo azul). Por lo tanto, las plantas ornamentales azules se limitan actualmente a la Genciana, *Delphinium* y *Oxypetalum*, de modo que sigue habiendo una demanda para desarrollar técnicas para regular la expresión azul que permitiría la creación de plantas ornamentales con colores genuinos de flores azules.

[0003]

El F3'5'H se conoce como un gen que se ha introducido con el fin de lograr la modificación del color de la flor para obtener flores azules (PTL 1). La introducción de F3'5'H solo o junto con un constructo que inhibe la expresión endógena de F3'H o DFR, puede modificar el color de la flor hacia el azul al convertir las antocianinas de los pétalos en el tipo delfinidina (figura 1). Cuando se introduce CamF3'5'H en el crisantemo (NPL 1 y PTL 2), se sabe que altera el color a violeta (tabla de colores RHS: grupo violeta 83) o violeta (grupo violeta 88), que tiene un ángulo de tonalidad de aproximadamente 315° (PTL 3 y NPL 2). También se sabe que los crisantemos que se obtienen por expresión de pensamiento F3'5'H (PTL 1) y la inhibición de F3'H endógeno exhiben colores que son morados (grupo violeta-morado N82) o violetas (grupo violeta 84) (PTL 4 y NPL 3). Además, cuando el A3'5'OMT (PTL 5) y el CamF3'5'H se coexpresan para sintetizar y acumular antocianina de malvidina, se obtienen crisantemos más azules que exhiben un ángulo de tonalidad de 305° a 315° (violeta) (NPL 4). Se ha documentado que es posible producir transformantes con flores violetas o moradas a partir del clavel (NPL 5), de la rosa (PTL 6, NPL 6), del lirio (PTL 7), de la dalia (NPL 7) y de la orquídea *Phalaenopsis* (PTL 8, PTL 9).

[0004]

Aunque los colores de flores violetas o moradas se pueden crear mediante técnicas convencionales para producir colores azules con el uso de F3'5'H o A3'5'OMT, no ha sido posible crear transformantes con colores genuinos de flores azules que se encuentran en el grupo violeta-azul o grupo azul, los cuales exhiben ángulos de tonalidad de 230° a 290°.

También se han dilucidado varios mecanismos de expresión azul (NPL 8), con los

genes asociados documentados que incluyen genes que regulan: la poliacilación de antocianinas mediante ácidos orgánicos aromáticos que promueven la asociación intramolecular (figura 2) (PTL 10, PTL 11, PTL 12, PTL 13, PTL 14, NPL 9), la síntesis de antocianinas y copigmentos que promueven la asociación intermolecular (PTL 15, PTL 16, PTL 17), el ajuste del pH intravacuolar (PTL 18, PTL 19), el transporte de iones metálicos a vacuolas (PTL 20 , NPL 10) y la síntesis de flavonas metálicas formadoras de complejos (PTL 21); sin embargo, no existen ejemplos exitosos de obtención de colores azules en las plantas ornamentales a las que se han transferido. La poliacilación con ácidos orgánicos aromáticos también tiene lugar en los residuos de glucosilo de antocianinas y se ha documentado que un gen 3', 5'-O-glucosiltransferasa de antocianina derivado de clitoria (CtA3'5'GT) regula la adición de residuos de glucosilo (PTL 22). También se ha documentado la alteración del color de la flor al azul como resultado de transferir el gen a la lobelia malva que acumula 3-glucósido de delfinidina, y aproximadamente el 70% de las antocianinas acumuladas en los pétalos tienen los grupos de 3' y 5'-glucosilo modificados con grupos de acilo aromáticos, debido a la función de 3'-aciltransferasa endógena (3'AT) y 5'AT en la lobelia. Como la acumulación de antocianinas poliaciladas es un factor en la alteración del color de la flor de lobelia al azul, esto indica que la creación de la flor azul por transformación del gen CtA3'5'GT requiere la coexpresión de genes de aciltransferasa aromática tales como Ct3'AT (NPL 11). De hecho, se ha demostrado que la alteración al azul no se logra si el CtA3'5'GT solo se transfiere al crisantemo (ejemplos de referencia 1 y 2).

Por lo tanto, se deben expresar y realizar múltiples genes para construir el mecanismo de expresión de color azul, pero como el funcionamiento en plantas transformadas nunca está garantizado, las flores con colores azules genuinos no pueden crearse simplemente al dilucidar los mecanismos de expresión azul e indicar los genes responsables.

Lista de referencias

Documentos de patente (PTL)

[0005]

[PTL 1] Solicitud de patente internacional No. WO2004/020637

[PTL 2] Solicitud de patente internacional No. WO2013/157502

[PTL 3] Solicitud de patente internacional No. WO2010/122849
[PTL 4] Solicitud de patente internacional No. WO2009/062253
[PTL 5] Solicitud de patente internacional No. WO2003/062428
[PTL 6] Solicitud de patente internacional No. WO2005/017147
[PTL 7] Solicitud de patente internacional No. WO2012/036290
[PTL 8] Solicitud de patente japonesa No. 5285304
[PTL 9] Solicitud de patente internacional No. WO2008/136434
[PTL 10] Solicitud de patente japonesa No. 4853853
[PTL 11] Solicitud de patente japonesa No. 4982782
[PTL 12] Solicitud de patente internacional No. WO1996/025500
[PTL 13] Solicitud de patente internacional No. WO2006/046780
[PTL 14] Solicitud de patente internacional No. WO2011/016260
[PTL 15] Solicitud de patente internacional No. WO2008/156211
[PTL 16] Solicitud de patente internacional No. WO2008/156214
[PTL 17] Solicitud de patente internacional No. WO2008/156206
[PTL 18] Solicitud de patente internacional No. WO2001/14560
[PTL 19] Solicitud de patente japonesa No. 507282
[PTL 20] Solicitud de patente japonesa No. 4958247
[PTL 21] Solicitud de patente internacional No. WO2012/096307
[PTL 22] Solicitud de patente japonesa No. 4418865

Documentos que no son de patente (NPL)

[NPL 1] Biosci. Biotechnol. Biochem. (2003) 67:161
[NPL 2] Plant Cell Physiol (2013) 54:1684
[NPL 3] Plant Cell Physiol (2013) 54:1696
[NPL 4] ICP2014:251
[NPL 5] Phytochemistry (2003) 63:15
[NPL 6] Plant Cell Physiol (2007) 48:1589
[NPL 7] Noury to Engei (2012), Octubre, pág.42, Agricultural Technology Digest
Appendix No. 15, 330, 1, 192.
[NPL 8] Nat Prod Rep (2009) 26:857
[NPL 9] Plant Cell Physiol (2015) 56:28

[NPL 10] Plos one (2012) 7:e43189

[NPL 11] Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology, Tsukuba Convention - Symposium Lecture Abstracts (2006) pág.40

Resumen de la invención

Problema técnico

[0007]

El problema que se resolverá mediante la presente invención es la de proporcionar plantas de crisantemo transformadas con un color de flor azul, o sus progenies endogámicas o exogámicas, o sus propágulos, cuerpos parciales de plantas, tejidos o células.

Solución al problema

[0008]

Como resultado de una investigación y experimentación diligentes llevadas a cabo con el objetivo de resolver el problema mencionado anteriormente, los presentes inventores han completado esta invención al encontrar que cuando el gen 3', 5'-O-glucosiltransferasa de antocianina derivado de clitoria (CtA3'5'GT) y el gen 3', 5'-hidroxilasa flavonoide derivado de campánula (CamF3'5'H) se coexpresan en pétalos de crisantemo, es posible obtener plantas de crisantemo transformadas que tienen un color de flor azul que no se podía lograr anteriormente (tabla de colores RHS, 5ª Edición: grupo violeta-azul/grupo azul y/o ángulo de tonalidad: 230° a 290°).

[0009]

En especial, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] Un casete de expresión que comprende:

un primer polinucleótido seleccionado del grupo que consta de los siguientes (1-a) a (1-e):

(1-a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que figura como la SEC ID NO: 1;

(1-b) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que figura como la SEC ID NO: 1 en condiciones rigurosas, el polinucleótido que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas;

(1-c) un polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 2;

(1-d) un polinucleótido que comprende una secuencia de aminoácidos, la cual es la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 2 con una delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, y que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a los grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas; y

(1-e) un polinucleótido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 2 y que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a los grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas, y

un segundo polinucleótido seleccionado del grupo que consta de los siguientes (2-a) a (2-e):

(2-a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que figura en la SEC ID NO: 3;

(2-b) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que figura como la SEC ID NO: 3 en condiciones rigurosas, el polinucleótido que codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides;

(2-c) un polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 4;

(2-d) un polinucleótido que comprende una secuencia de aminoácidos, la cual es la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 4 con una delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, y que codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides; y

(2-e) un polinucleótido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 4 y que codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides.

[2] El casete de expresión de acuerdo con [1], que incluye además un primer promotor y un primer terminador unidos funcionalmente al primer polinucleótido, y un

segundo promotor y un segundo terminador unidos funcionalmente al segundo polinucleótido.

[3] El casete de expresión de acuerdo con [2], en el que el primer promotor es el promotor F3H de crisantemo y el primer terminador es el terminador de *Arabidopsis* HSP o el terminador de *Agrobacterium* nos.

[4] El casete de expresión de acuerdo con [2] o [3], en el que el segundo promotor es el promotor F3H de crisantemo y el segundo terminador es el terminador de *Arabidopsis* HSP o el terminador de *Agrobacterium* nos.

[5] Un vector que incluye un casete de expresión de acuerdo con una cualquiera de [1] a [4].

[6] Una planta de crisantemo transformada que incluye un casete de expresión de acuerdo con una cualquiera de [1] a [4], o sus progenies endogámicas o exogámicas, o sus propágulos, cuerpos parciales de plantas, tejidos o células.

[7] Una planta de crisantemo transformada, o sus progenies endogámicas o exogámicas, o sus propágulos, cuerpos parciales de plantas, tejidos o células de acuerdo con [6], en la que el gen 3', 5'-O-glucosiltransferasa de antocianina derivado de clitoria (tA3'5'GT) y el gen 3', 5'-hidroxilasa flavonoide derivado de campánula (CamF3'5'H) se coexpresan en los pétalos del crisantemo.

[8] Una planta de crisantemo transformada, o sus progenies endogámicas o exogámicas, o sus propágulos, cuerpos parciales de plantas, tejidos o células de acuerdo con [6] o [7], que contienen 3'5'-diglucósido de 3'-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y/o 3,3',5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5).

[9] Flores cortadas de plantas de crisantemo transformadas o sus progenies endogámicas o exogámicas de acuerdo con [6] a [8], o una forma procesada creada a partir de las flores cortadas.

[10] Un método para crear plantas de crisantemo transformadas con un color de flor azul, el método que comprende una etapa de introducir:

un primer polinucleótido seleccionado del grupo que consta de los siguientes (1-a) a (1-e):

(1-a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que figura como la SEC ID NO: 1;

(1-b) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que figura como la SEC ID NO: 1 en condiciones rigurosas, el polinucleótido que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas;

(1-c) un polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 2;

(1-d) un polinucleótido que comprende una secuencia de aminoácidos, la cual es la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 2 con una delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, y que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a los grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas; y

(1-e) un polinucleótido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 2 y que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a los grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas, y/o

un segundo polinucleótido seleccionado del grupo que consta de los siguientes (2-a) a (2-e):

(2-a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que figura en la SEC ID NO: 3;

(2-b) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que figura como la SEC ID NO: 3 en condiciones rigurosas, el polinucleótido que codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides;

(2-c) un polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 4;

(2-d) un polinucleótido que comprende una secuencia de aminoácidos, la cual es la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 4 con una delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, y que codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides; y

(2-e) un polinucleótido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 4 y que

codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides, en un huésped.

[11] El método de acuerdo con [10], que se lleva a cabo mediante la transformación de un huésped con un casete de expresión de acuerdo con una cualquiera de [1] a [4] o un vector de acuerdo con [5].

[12] El método de acuerdo con [11], en el que el color de la flor azul está en el grupo azul o el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS y/o tiene un ángulo de tonalidad de 230° a 290° en el sistema de color CIEL*a*b*.

[13] Una planta de crisantemo transformada creada mediante el método de acuerdo con una cualquiera de [10] a [12], o sus progenies endogámicas o exogámicas, o sus propágulos, cuerpos parciales de plantas, tejidos o células.

[14] Flores cortadas de plantas de crisantemo transformadas o sus progenies endogámicas o exogámicas de acuerdo con [13], o una forma procesada creada a partir de las flores cortadas.

Efectos ventajosos de la invención

[0010]

Como resultado del análisis de las antocianinas de pétalos de los transformantes de crisantemo con rasgos de flor azul obtenidos de acuerdo con la invención, se encontró que la antocianina principal recientemente sintetizada era 3' 5'-diglucósido de 3'-(6''-malonil)glucósido de delphinidina (ternatina C5) y se encontró que las antocianinas traza eran 3,3',5'-triglucósido de delphinidina (preternatina C5), 3'5'-diglucósido de 3'-(3'',6''-dimalonil)glucósido de delphinidina, 3'-glucósido de 3'-(6''-malonil)glucósido de delphinidina y 3'-glucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de cianidina, mientras que no hubo detección de antocianinas poliacriladas con ácidos orgánicos aromáticos que produjeran color azul mediante asociación intramolecular. En otras palabras, y de acuerdo con la invención, es posible impartir un rasgo de color de flor azul al crisantemo mediante hidroxilación y glicosilación simple en la posición 3' y la posición 5' de antocianinas. La presente invención se basa en una tecnología para regular la expresión del color azul que es completamente diferente a la teoría y a la tecnología del arte previo y que no requiere la poliacilación mediante grupos de acilo aromáticos, los cuales son necesarios en el pasado para expresar el color azul.

Breve descripción de los dibujos

[0011]

La figura 1 muestra el glucósido de delphinidina sintetizado en pétalos de crisantemo mediante la introducción F3'5'H.

La figura 2 muestra la poliacilación de antocianinas mediante ácidos orgánicos aromáticos que promueven la asociación intramolecular (un ejemplo de biosíntesis de ternatina en clitoria).

La figura 3 muestra los resultados del análisis de HPLC-MS para las antocianinas principales en pétalos de crisantemo azul.

La figura 4 muestra la estructura química y los resultados del análisis LC-MS/MS para las antocianinas principales en pétalos de crisantemo azul.

La figura 5 muestra fotografías de la coloración a azul del color de la flor de crisantemo en la que se transformaron CamF3'5'H y CtA3'5'GT, además se muestran los resultados del análisis de HPLC para las antocianinas principales en los pétalos de crisantemo azul.

La figura 6 es un conjunto de fotografías que muestran los colores de las flores de los crisantemos en los que se transformó CtA3'5'GT.

[0012]

La presente invención hace referencia a un casete de expresión que comprende:
un primer polinucleótido seleccionado del grupo que consta de los siguientes (1-a) a (1-e):

(1-a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que figura como la SEC ID NO: 1;

(1-b) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que figura como la SEC ID NO: 1 en condiciones rigurosas, el polinucleótido que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas;

(1-c) un polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 2;

(1-d) un polinucleótido que comprende una secuencia de aminoácidos, la cual es la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 2 con una delección, sustitución,

inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, y que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a los grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas; y

(1-e) un polinucleótido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 2 y que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a los grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas, y un segundo polinucleótido seleccionado del grupo que consta de los siguientes (2-a) a (2-e):

(2-a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que figura en la SEC ID NO: 3;

(2-b) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que figura como la SEC ID NO: 3 en condiciones estrictas, el polinucleótido que codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides;

(2-c) un polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 4;

(2-d) un polinucleótido que comprende una secuencia de aminoácidos, la cual es la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 4 con una delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, y que codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides; y

(2-e) un polinucleótido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 4 y que codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides.

[0013]

A lo largo de la presente especificación, el término “polinucleótido” se refiere a ADN o ARN, y en el casete de expresión de la invención, el primer polinucleótido codifica la 3', 5'-O-glucosiltransferasa de antocianina derivado de clitoria o su análogo y el segundo polinucleótido codifica la 3', 5'-hidroxilasa flavonoide derivado de campánula o su análogo. En el presente documento, “codifica” significa que permite la expresión de la proteína de interés en un estado en el que exhibe su actividad. Además, el término “codifica” incluye tanto la codificación de una secuencia estructural (exón), que es una

sección continua de la proteína de interés, como la codificación a través de una secuencia intermedia (intrón).

[0014]

La 3', 5'-O-glucosiltransferasa de antocianina es una enzima que cataliza la reacción de la transferencia sucesiva de azúcares a los grupos de hidroxilo en las posiciones 3' y 5' de la antocianina y se encuentra en los pétalos de las flores azules de la clitoria. Se cree que los pétalos de la clitoria exhiben su color azul debido a la acumulación de delfinidinas poliacriladas, que tienen los grupos de hidroxilo en las posiciones 3' y 5' de la antocianina glicosilada, y también se han modificado adicionalmente por grupos de acilo aromáticos. La 3', 5'-hidroxilasa flavonoide es una enzima que hidroxila las posiciones 3' y 5' de flavonoides y se ha encontrado en los pétalos de flores azules de campánula. Se cree que grandes cantidades de antocianinas de tipo delfinidina se acumulan en pétalos en los que se expresa F3'5'H, lo que permite exhibir colores malva, violeta, morado y azul. Sin embargo, la planta de crisantemo no tiene un gen que codifique la 3', 5'-O-glucosiltransferasa de antocianina ni un gen que codifique la 3', 5'-hidroxilasa flavonoide.

Además, debido a que el crisantemo tiene una poliploidía mayor, específicamente hexaploidia y un tamaño grande del genoma, su eficacia de transformación es baja y también suele producirse silenciamiento (inactivación) de los genes transferidos, por lo que no es fácil obtener un crisantemo recombinante de genes que exhiba expresión estable mediante transferencia de estos genes. Además, el azul no se produce en los pétalos a pesar de que incluso se hayan transferido CtA3'5'GT o CamF3'5'H con éxito, razón por la cual actualmente no se conocen plantas de crisantemo transformadas con un color de flor azul.

[0015]

Como se utiliza en el presente documento, el término “condiciones rigurosas” se refiere a las condiciones que permiten la unión específica entre un polinucleótido u oligonucleótido y ADN genómico de una manera selectiva y detectable. Las condiciones rigurosas se definen mediante una combinación apropiada de concentración de sal, disolvente orgánico (por ejemplo, formamida), temperatura y otras condiciones conocidas.

En especial, se incrementa la rigurosidad al reducir la concentración de sal, al aumentar la concentración de disolvente orgánico o al elevar la temperatura de hibridación. La rigurosidad también se ve afectada por las condiciones de enjuague después de la

hibridación. Las condiciones de enjuague se definen por la concentración de sal y la temperatura, y la rigurosidad del enjuague aumenta al reducir la concentración de sal y al elevar la temperatura. Por lo tanto, el término “condiciones rigurosas” da a entender condiciones tales que la hibridación específica tiene lugar solo entre secuencias de nucleótidos con alta identidad, tal como un grado de “identidad” entre las secuencias de nucleótidos de aproximadamente 80% o más, de preferencia de aproximadamente 90% o más, de preferencia de aproximadamente 95% o más, de preferencia de aproximadamente 97% o más y de mayor preferencia de aproximadamente 98% o más, en promedio.

Las “condiciones rigurosas” pueden ser de, por ejemplo, una temperatura de 60°C a 68°C, una concentración de sodio de 150 a 900 mM y de preferencia de 600 a 900 mM, y un pH de 6 a 8, con ejemplos específicos que incluyen hibridación bajo condiciones de 5 x SSC (NaCl de 750 mM, citrato trisódico de 75 mM), 1% de SDS, 5 x solución Denhardt, 50% de formaldehído, 42°C, y enjuague bajo condiciones de 0.1 x SSC (NaCl de 15 mM, citrato trisódico de 1.5 mM), 0.1% de SDS, 55°C.

[0016]

La hibridación puede llevarse a cabo mediante un método que se conoce públicamente en el campo o un método similar, tal como el método descrito en *Current Protocols in Molecular Biology* (editado por Frederick M. Ausubel et al., 1987). Al utilizar una biblioteca disponible comercialmente, se puede llevar a cabo de acuerdo con el método descrito en las instrucciones de uso adjuntas. El gen seleccionado por dicha hibridación puede derivarse de forma natural, tal como derivado de plantas o no derivado de plantas. El gen seleccionado por la hibridación puede ser ADNc, ADN genómico o ADN sintetizado químicamente.

[0017]

La frase “secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos” significa una secuencia de aminoácidos que tiene una delección, sustitución, inserción y/o adición de cualquier número de aminoácidos que pueden ser de 1 a 20, de preferencia de 1 a 5 y de mayor preferencia de 1 a 3. La mutagénesis específica de sitio es un método de ingeniería genética útil, ya que permite la introducción de mutaciones específicas en sitios específicos y puede llevarse a cabo mediante el método descrito en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Al expresar el ADN mutante con el uso de un sistema de expresión adecuado, es posible obtener una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o varios aminoácidos.

Un polinucleótido puede obtenerse mediante un método que es conocido públicamente por aquellos versados en la materia, tal como un método de síntesis química que utiliza el método de fosforamidita, o un método de amplificación de ácido nucleico que utiliza una muestra de ácido nucleico de planta como patrón, y cebadores diseñados con base en la secuencia de nucleótidos del gen diana.

[0018]

A lo largo de la presente especificación, el término “identidad” significa, para secuencias polipeptídicas (o secuencias de aminoácidos) o secuencias de polinucleótidos (o secuencias de nucleótidos), la cantidad (número) de residuos de aminoácidos o nucleótidos que las componen y que pueden determinarse como idénticas entre las dos cadenas, en el sentido de un mutuo acuerdo entre ellas, lo que significa el grado de correlación de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas o dos secuencias de polinucleótidos, y ésta “identidad” se puede calcular fácilmente. Se conocen numerosos métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o secuencias polipeptídicas, y el término “identidad” es bien conocido por aquellos versados en la materia (por ejemplo, véase Lesk, AM (Ed.), Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (Ed.), Computer Analysis of Sequence Data: Parte I, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), Sequence Analysis Primer, M-Stockton Press, New York, (1991) y en otros lugares).

[0019]

Además, los valores numéricos para la “identidad” que se utiliza en la presente especificación, a menos que se especifique lo contrario, pueden ser los valores numéricos calculados con el uso de un programa de búsqueda de identidad conocido por aquellos versados en la materia, pero de preferencia son valores numéricos que se calculan con el uso del programa ClustalW de Aplicación MacVector (versión 9.5, Oxford Molecular Ltd.,

Oxford, Inglaterra). Según la invención, el grado de “identidad” entre secuencias de aminoácidos es, por ejemplo, de aproximadamente 80% o más, de preferencia de aproximadamente 90% o más, de preferencia de aproximadamente 95% o más, de preferencia de aproximadamente 97% o más y de mayor preferencia de aproximadamente 98% o más.

[0020]

Por ejemplo, se puede obtener un gen con una secuencia de nucleótidos natural mediante análisis con el uso de un secuenciador de ADN. Además, se puede sintetizar un polinucleótido que codifica una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos modificada que utiliza mutagénesis común específica de sitio o PCR, en base a un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos natural. Por ejemplo, mediante tratamiento con enzimas de restricción de ADNc natural o ADN genómico, se puede obtener un fragmento de polinucleótido que se va a modificar y se puede utilizar como patrón para mutagénesis específica de sitio o PCR que utiliza cebadores con la mutación deseada, con el fin de obtener un fragmento de polinucleótido que tiene la modificación deseada. El fragmento de polinucleótido que tiene la mutación puede unirse a continuación con un fragmento de ADN que codifica otra porción de la enzima diana.

De manera alternativa, con el fin de obtener un polinucleótido que codifica una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos acortada, por ejemplo, con una enzima de restricción seleccionada, se puede cortar una secuencia de aminoácidos que es más larga que la secuencia de aminoácidos diana, tal como un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de longitud completa, y si el fragmento de polinucleótido resultante no codifica toda la secuencia de aminoácidos diana, se puede sintetizar y unir a él un fragmento de ADN que comprende la porción faltante de la secuencia.

[0021]

Al expresar el polinucleótido obtenido con el uso de un sistema de expresión de genes en *Escherichia coli* o levadura y al medir la actividad de la enzima, es posible confirmar que el polinucleótido obtenido codifica una proteína con la actividad deseada. Al expresar el polinucleótido, es posible obtener una proteína con la actividad deseada como un producto polinucleotídico. De manera alternativa, se puede obtener una proteína con actividad de transferencia de azúcares a los grupos de hidroxilo en las posiciones 3' y 5' de

las antocianinas con el uso de un anticuerpo para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 2, y dicho anticuerpo también se puede utilizar para la clonación de un polinucleótido que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a los grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas, que se derivan de otro organismo. Asimismo, se puede obtener una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides con el uso de un anticuerpo para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que figura como la SEC ID NO: 4, y dicho anticuerpo también se puede utilizar para la clonación de un polinucleótido que codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides, que se derivan de otro organismo.

[0022]

Tal como se utiliza en el presente documento, “casete de expresión” significa un fragmento de polinucleótido que tiene opcionalmente un promotor y un terminador unidos al polinucleótido. El casete de expresión de la invención puede incluir además un primer promotor y/o un primer terminador unido funcionalmente a un primer polinucleótido que codifica la 3', 5'-O-glucosiltransferasa de antocianina derivado de clitoria o un análogo de la misma, y un segundo promotor y/o segundo terminador funcionalmente unido a un segundo polinucleótido que codifica la 3', 5'-hidroxilasa flavonoide derivado de campánula o un análogo de la misma.

[0023]

Los promotores y terminadores que se usarán en el casete de expresión de la invención no están particularmente restringidos siempre que puedan causar la coexpresión del gen 3', 5'-O-glucosiltransferasa de antocianina derivado de clitoria (CtA3'5'GT) y del gen 3', 5'-hidroxilasa flavonoide derivado de campánula (CamF3'5'H) en pétalos de crisantemo, pero el primer promotor es de preferencia el promotor F3H de crisantemo y especialmente el F3H1k de crisantemo o el F3H500 de crisantemo, el primer terminador es de preferencia el terminador de *Arabidopsis* HSP o el terminador de *Agrobacterium nos*, el segundo promotor es de preferencia el promotor F3H de crisantemo, y el segundo terminador es de preferencia el terminador de *Arabidopsis* HSP o el terminador de *Agrobacterium nos*.

[0024]

La presente invención se refiere a un vector (recombinante), especialmente, a un vector de expresión, que incluye el casete de expresión mencionado anteriormente, y a plantas de crisantemo transformadas mediante el vector.

[0025]

La presente invención se refiere además a una planta de crisantemo transformada que se obtiene al transferir a un huésped un primer polinucleótido que codifica una proteína con actividad de transferencia de azúcares a los grupos de 3' y 5' hidroxilo de antocianinas y/o un segundo polinucleótido que codifica una proteína con actividad de hidroxilación de las posiciones 3' y 5' de flavonoides, como polinucleótidos exógenos, o sus progenies endogámicas o exogámicas, o sus propágulos, cuerpos parciales de plantas, tejidos o células. La transferencia de los polinucleótidos se puede conseguir mediante la transformación de un huésped con un casete de expresión o vector de la invención. De manera alternativa, cuando se expresan en el huésped ya sea el gen 3', 5'-O-glucosiltransferasa de antocianina derivado de clitoria (CtA3'5'GT) o el gen 3', 5'-hidroxilasa flavonoide derivado de campánula (CamF3'5'H), es suficiente transferir solo el primer polinucleótido o el segundo polinucleótido al huésped.

[0026]

Con el fin de transferir un polinucleótido a una planta y expresar el polinucleótido de una manera constitutiva o específica de tejido, se puede utilizar cualquier método conocido públicamente por aquellos versados en la materia bajo los estándares técnicos actuales, tales como el método de *Agrobacterium*, el método de vector binario, el método de electroporación, el método PEG o el método de pistola de partículas.

[0027]

A lo largo de la presente especificación, el término “planta de crisantemo” (también simplemente “crisantemo”) significa una planta del género crisantemo de la familia *Asteraceae*. El género crisantemo incluye C. japonense, C. zawadskii var. latilobum, C. indicum var. procumbens, C. zawadskii and C. pacificum, que comúnmente se conocen como crisantemos silvestres. También incluye variedades cruzadas diversamente como el crisantemo de pompones (*spray chrysanthemum*), el *ogiku* y el *kogiku*, que se obtienen por hibridación entre variedades silvestres y comúnmente conocidas como *Chrysanthemum*

morifolium o crisantemo cultivado (*Chrysanthemum morifolium* (anteriormente: *Dendranthema grandiflora*, *Chrysanthemum grandiflorum*)). De acuerdo con la invención, no existen restricciones particulares sobre los tipos de plantas de crisantemo que pueden utilizarse como huéspedes, y se pueden utilizar diversas variedades y líneas de crisantemo que se han seleccionado y criado para diversos fines decorativos, tales como los crisantemos de pompones, los crisantemos sin botones y los crisantemos de matera, o diversas variedades de crisantemo y líneas que tienen diferentes flores, como los crisantemos de anémonas, los crisantemos decorativos, los crisantemos de pompones y las margaritas (crisantemos individuales). Los ejemplos que se describen a continuación muestran colores de flores azules en el grupo azul o azul violeta según la tabla de colores RHS, 5ª edición (Royal Horticultural Society), o con un ángulo de tonalidad del sistema de color CIEL*a*b* de 230° a 290° que se obtiene mediante la medición con un medidor de crominancia o espectrómetro de tonos de color, que se exhibe en huéspedes de diversas variedades y líneas, tales como Sei Shawl (S39), Taihei, T27, Sei Arabella (T34), T37, Candela Tierra, T10, T24, T44, y T57 (ángulo de tonalidad promedio: ~5° a 0° (360°) a ~337°; tabla de colores RHS: grupo rojo 49C-D al grupo rojo-morado al grupo morado 75B-C).

[0028]

Las antocianinas principales en las plantas de crisantemo que se utilizan como huéspedes y que exhiben colores de flores en el grupo rojo, el grupo rojo-morado y el grupo morado son 3-(6''-malonil)glucósido de cianidina y 3-(3'', 6''-dimalonil)glucósido de cianidina. La antocianina principal del crisantemo transformado que se obtiene mediante la transferencia y el funcionamiento del gen F3'5'H de campánula es 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina, con cantidades de traza de 3-(3'', 6''-dimononil)glucósido de delfinidina. El 3-(6''-malonil)glucósido de cianidina y el 3-(3'', 6''-dimalonil)glucósido de cianidina tienen una longitud de onda máxima de absorción visible de 518 nm, mientras que la del 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina es de 527 nm. El crisantemo transformado que incluye principalmente 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina exhibe un color de morado a violeta, debido a este cambio hacia el extremo de la longitud de onda larga. Por otro lado, se ha demostrado que el crisantemo azul, creado al expresar tanto el gen F3'5'H de campánula como el gen A3'5'GT de clitoria en

pétalos de crisantemo, incluye 3',5'-diglucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) como el pigmento principal, que a la vez incluye 3,3', 5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5), 3'5'-diglucósido de 3-(3'', 6''-dimalonil)glucósido de delfinidina y 3'-glucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina como pigmentos de trazas, que son formas demalniladas de ternatina C5 y 3'-glucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de cianidina. El 3',5'-diglucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5), que es la principal antocianina del crisantemo azul, tiene una absorción de longitud de onda máxima de absorción visible de 512 nm, que se desplaza además hacia el extremo corto de la longitud de onda en lugar de al 3-(6''-malonil)glucósido de cianidina, la antocianina principal en los colores rojo y rosa originales. Esto significa que el 3',5'-diglucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5), aunque es más rojo que el pigmento original, vuelve azules a los pétalos del crisantemo. Por lo tanto, aunque se cree que los pétalos están expresando color azul debido a la interacción entre el 3',5'-diglucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y las sustancias de copulación endógenas en crisantemo, a la fecha, no se han documentado ejemplos de expresión de color azul mediante antocianinas rojas en las que tanto los grupos de 3'- y 5'-hidroxilo del anillo B de antocianina se han glucosilado, como el 3',5'-diglucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5), como la presente invención se basan en una técnica para regular la expresión del color azul que es completamente diferente de la teoría y tecnología del arte previo y no requiere la poliacilación por grupos de acilo aromáticos que ha sido necesaria en el pasado para expresar el color azul.

[0029]

La presente invención hace referencia además a flores cortadas de plantas de crisantemo transformadas obtenidas tal como se describió anteriormente o sus progenies endogámicas o exogámicas, o una forma procesada creada a partir de flores cortadas (especialmente flores cortadas procesadas). Las flores cortadas procesadas a las que se hace referencia aquí incluyen flores prensadas que se forman con el uso de flores cortadas o flores preservadas, flores secas o productos sellados con resina, sin limitarse a estos.

[0030]

La presente invención se explicará ahora con mayor detalle mediante ejemplos.

Los métodos de biología molecular que se utilizan se basaron en la clonación molecular (Sambrook y Russell, 2001), a menos que se especifique lo contrario. La ausencia de errores en las secuencias de ADN de los productos de PCR amplificados y los plásmidos obtenidos por clonación se confirmaron en base a las secuencias de nucleótidos.

Ejemplos

[0031]

[Ejemplo 1: Introducción de pB423 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

La PCR se llevó a cabo con el uso de pBluescript SK-gF3H9 (Kanno et al. (2001), J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70 (vol. 2) 193) como patrón y el HANS-F3Hpro1k-Fd (5’-CCAAGCTTGGCGCGCCGCGCCGCATTTAAATTTACAAAACCATGTGCAAGAA TG-3’; el subrayado indica la secuencia que se alinea con el ADN que contiene la región del promotor F3H; SEC ID NO: 5) y el SNM-F3Hpro-RV (5’-ACTAGTGCTAGCACGCGTTTTTTTATTTTTTCTTCACACACTTG-3; el subrayado indica la secuencia que se alinea con el ADN que contiene la región del promotor F3H; SEC ID NO: 6) como cebadores, para amplificar un fragmento de ADN que contiene el 1k del promotor CmF3H que tiene sitios de restricción de enzimas HindIII, AscI, NotI y SmaI añadidos al extremo 5’ y sitios de restricción de enzimas SpeI y NheI añadidos al extremo 3’, y el fragmento se usó luego para la clonación de TA en pGEM-T Easy (Promega) y se digirió con HindIII y SpeI para obtener un fragmento de ADN.

La PCR se llevó a cabo con el uso de pBI221 como patrón y el SSS-NOSter-Fd (5’-GAGCTCACTAGTGTCGACGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAG-3’; el subrayado indica la secuencia que se alinea con el ADN que contiene la región del terminador NOS; SEC ID NO: 7) y el ESP-NOSter-RV (5’-CGAATTCAGGCCTGTTTAAACGATCTAGTAACATAGATGACAC-3’; el subrayado indica la secuencia que se alinea con el ADN que contiene la región del terminador NOS; SEC ID NO: 8) como cebadores, para amplificar un fragmento de ADN que contiene el terminador de *Agrobacterium nos* con sitios de restricción de enzimas SacI, EcoICRI

(Ecl136II), SpeI y SalI añadidos al extremo 5' y sitios de restricción de enzimas PmeI, SrfI y EcoRI añadidos al extremo 3', y el fragmento se usó luego para la clonación de TA en pCR2.1 (Invitrogen) y se digirió con SacI y EcoRI para obtener un fragmento de ADN que contiene el terminador de *Agrobacterium nos*.

Se insertaron el fragmento de ADN del 1k del promotor de CmF3H añadido al sitio de restricción de enzimas y el fragmento de ADN del terminador NOS en lugar de la región HindIII-XbaI que contiene el promotor CaMV 35S y la región SacI-EcoRI que contiene el terminador NOS de pBI221, y tras la digestión con HindIII y EcoRI, el casete HANS-CmF3Hp1k: GUS: NOST-PSE obtenido se unió con un fragmento plásmido obtenido mediante digestión de pSPORT2 (Invitrogen) con HindIII y EcoRI, con el fin de obtener pMCE5 como vector de entrada para el acoplamiento del casete de expresión de genes de manera continua con el vector binario.

[0032]

Se construyó el pMCE5-2 plásmido, en el que el sitio de restricción de enzimas del extremo 5' del promotor del vector de entrada pMCE5 para la unión del casete de expresión de genes de una manera continua con el vector binario, se modificó a HindIII, FseI, AscI, StuI, SwaI, y el terminador se cambió del terminador de *Agrobacterium nos* al terminador *Arabidopsis* HSP 18.2 (Proteína de Choque Térmico de *Arabidopsis*) (AtHSPter, Plant Cell Physiol. 51(2): 328-332 (2010); SEC ID NO: 37). Los sitios de restricción de enzimas EcoICRI, SacI, SpeI y SalI se añadieron al extremo 5' y los SrfI, SmaI, PmeI, EcoRI, KpnI al extremo 3' de AtHSPter.

La PCR se llevó a cabo con el uso de pBluescript SK-gF3H9 como patrón y el hFASw-proCmF3H-Fd (5'-

AAGCTTGGCCGGCCTAGGCGCGCCAGGCCTATTTAAATTTACAAAACCATGTG
CAAGAATG-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con el ADN de la región del promotor F3H; SEC ID NO: 9) y el SNM-F3Hpro-Rv (5'-
ACTAGTGCTAGCACGCGTTTTTTATTTTTTCTTCACACACTTG-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con el ADN de la región del promotor F3H; SEC ID NO: 6) como cebadores, y el fragmento de ADN amplificado se clonó en pCR-BluntII-TOPO (Life Technologies) para obtener pCR-FASS-CmF3Hpro1k. El fragmento de ADN FASS-CmF3Hpro1k obtenido mediante digestión de este plásmido con HindIII y NheI y el

fragmento de ADN plasmídico obtenido mediante digestión de pMCE5 con HindIII y SpeI se unieron para obtener pMCE5-FASS.

La PCR se llevó a cabo con el uso de pCR-HSP como patrón y el SSS-terHSP-Fd (5'-GAGCTCACTAGTGTCTGACATATGAAGATGAAGATGAAAT-3'; el subrayado indica la secuencia de ADN que se alinea con t AtHSPter; SEC ID NO: 10) y el KESP-terHSP-Rv (5'-GGTACCGGTCCGGAATTCGTTTAAACGCCCCGGGCCTTATCTTTAATCATATTCCATAGTCC-3'; el subrayado indica la secuencia de ADN que se alinea con AtHSPter; SEC ID NO: 11) como cebadores, y el fragmento de ADN amplificado se clonó en pCR-BluntII-TOPO (Life Technologies) para obtener pCR-SSS-AtHSPter-PSEK. Con el fin de obtener pMCE5-2, se unió un fragmento de ADN AtHSPter obtenido mediante digestión de este plásmido con KpnI y SacI, con un fragmento de ADN de vector obtenido mediante digestión de pMCE5-FASS con SacI y KpnI.

[0033]

Se unió un fragmento de ADN plasmídico obtenido mediante digestión de pMCE5-2 con NheI y EcoICRI, con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb que se obtuvo al despuntar los extremos de un producto de digestión KpnI de pCR ADHNF-Campanula F3'5'H (patente japonesa No. 5697040), y luego se digirió con XbaI, con el fin de obtener pMCE5-2 ADHNF-CamF3'5'H. Se unió un fragmento de ADN de casete de expresión obtenido mediante digestión de este plásmido con AscI y PmeI, con un fragmento de ADN de vector binario que se obtuvo mediante digestión de pB249 obtenido en el ejemplo de referencia 2 con AscI y SwaI, con el fin de obtener pB423 (pBCtA3'5'GT+CamF3'5'H).

[0034]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transformado con pB423 (Hood, E.E. et al. (1993) "New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants". Transgenic Res. 2, 208-218, suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), se transformó la variedad de crisantemo mediano de color rosa "*Taihei*" (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura) con el fin de obtener 46 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro

espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se encontró en 26 líneas (57%) una alteración del color de la flor hacia el azul. La medición con el colorímetro espectroscópico se llevó a cabo en un mínimo de 3 pétalos y se calculó el promedio. El ángulo de tonalidad (Hue°) se calculó como $\arctan(b^*/a^*)$ y el croma (valor de C^*) se calculó como $(a^2+b^2)^{1/2}$. En 22 líneas (48% del total) se exhibió azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$ y en 22 líneas (48% del total) se exhibió el color de la flor en el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS. El pB423 plásmido que expresa esta CamF3'5'H bajo el control del promotor F3H de crisantemo y el terminador de *Arabidopsis* HSP y que también expresa A3'5'GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo es la construcción de transferencia génica más simple, y se obtuvo crisantemo azul en una alta proporción del 48%. Además, al utilizar el terminador de *Arabidopsis* HSP como el terminador para el gen F3'5'H derivado de campánula, se creó crisantemo azul en una proporción mayor que cuando se utiliza el terminador de *Agrobacterium nos* (ejemplos 4, 12-18).

[0035]

Se analizaron las antocianinas en la variedad de crisantemos “*Taihei*” que habían sido impartidas con un rasgo azul, mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (ACQUITY UPLC/cuadrupolo en tándem MS ACQUITY TQD, Japan Waters, K.K.). El solvente A fue 1% de agua destilada que contiene ácido fórmico y el solvente B fue 1% de acetonitrilo que contiene ácido fórmico. La elución en gradiente se llevó a cabo con la velocidad de flujo del disolvente a 0,1 ml/min, y el disolvente B al 0% y 5% durante 0-5 minutos y al 5% y 35% durante 5-20 minutos, y posteriormente se mantuvo al 35% durante 20-25 minutos. La columna que se utilizó fue una ACQUITY UPLC BEH C18 de 1,7 μm (2,1 i.d. x 100 mm, Japan Waters, K.K.) conectada a una columna de protección VanGuard (Japan Waters, K.K.), y el análisis se llevó a cabo con una temperatura de columna de 35°C. Como resultado del análisis de los datos espectrales que se obtuvieron mediante una matriz de fotodiodos a 530 nm, se observaron picos para la antocianina en tiempos de retención de aproximadamente 9 minutos (pico 1), 10,5 minutos (pico 2) y 12,7 minutos (pico 3) (figura 3). Las masas ($[M+H]^+$) fueron m/z 875 para el pico predominante 2, m/z 789 para el pico 1 y m/z 697 para el pico 3. Además, los resultados de la espectrometría de absorción de cada pico, en comparación con una muestra

preparada a partir de clitoria, y el análisis LC-MS/MS (figura 4) mostró que el pico 1 era 3,3',5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5), el pico 2 era 3', 5'-diglucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y el pico 3 era 3'-glucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de cianidina y que esa modificación de la estructura de antocianina deseada se había logrado mediante la expresión de los genes transferidos F3'5'H de campánula y A3'5'GT de clitoria. Los crisantemos expresaron color azul mediante la acumulación de los pigmentos principales de 3', 5'-diglucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y 3,3', 5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5).

Se detectó acumulación de las antocianinas recientemente sintetizadas 3', 5'-diglucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5), 3,3',5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5) y 3'-glucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de cianidina, mediante cromatografía en capa fina (TLC). Después de detectar un extracto de pétalo de ácido acético al 10% en una ubicación a 1,5 cm por debajo de una placa de vidrio de celulosa TLC (10 x 20 cm, Millipore) y secar al aire, se llevó a cabo el desarrollo en una ubicación a 7 cm desde el origen, en un tanque de revelado que contiene disolvente de revelado BAW (butanol:ácido acético:agua = 4:1:2 (v/v/v)). Después del revelado, la placa se secó y se llevó a cabo la detección bajo una lámpara fluorescente y luz UV (CSN-15AC, Cosmo Bio Co., Ltd., 254/360 nm). El valor de R_f de cada antocianina fue el siguiente: 3', 5'-diglucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5): 0.15, 3,3',5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5): 0.11, 3'-glucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de cianidina: 0.30.

A continuación en la Tabla 1, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 1]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1728-05	74,0	8,6	-6,6	322,4	10,8	N82C-D	Morado-violeta
1728-06	60,8	3,4	-19,6	279,9	19,9	97A	Violeta-azul
1728-07	57,4	4,1	-20,7	281,3	21,1	96B	Violeta-azul
1728-10	61,3	6,9	-20,7	288,4	21,9	94B	Violeta-azul
1728-12	63,3	3,6	-19,9	280,3	20,3	95C	Violeta-azul

1728-13	61,1	5,4	-18,9	285,9	19,7	94C-D	Violeta-azul
1728-17	68,3	1,1	-13,1	274,9	13,1	96D	Violeta-azul
1728-21	63,4	3,8	-20,7	280,3	21,0	97A	Violeta-azul
1728-23	69,6	3,5	-13,1	284,9	13,6	92B-C	Violeta-azul
1728-27	65,4	2,9	-13,8	281,7	14,1	96C-D	Violeta-azul
1728-28	59,9	4,2	-18,6	282,8	19,1	96C-D	Violeta-azul
1728-29	73,3	3,1	-7,6	292,6	8,2	85C-D	Violeta
1728-30	66,4	4,5	-13,8	287,9	14,5	94C-D	Violeta-azul
1728-31	63,8	2,8	-17,8	279,0	18,0	97A-B	Violeta-azul
1728-32	43,0	7,7	-28,8	285,0	29,8	95C	Violeta-azul
1728-33	59,5	4,1	-18,4	282,5	18,8	96C-D	Violeta-azul
1728-35	71,7	-0,1	-11,3	269,5	11,3	97A	Violeta-azul
1728-36	63,8	1,3	-19,5	273,9	19,6	97A	Violeta-azul
1728-37	64,7	7,5	-15,4	295,8	17,1	97B-C	Violeta-azul
1728-38	65,9	3,0	-15,4	280,8	15,7	97A-B	Violeta-azul
1728-43	72,7	4,3	-9,6	294,1	10,5	91B	Violeta-azul
2027-01	69,9	1,5	-14,1	276,1	14,2	97A/100C	Violeta-azul /Azul
2027-09	70,9	3,5	-14,8	283,2	15,2	96D	Violeta-azul
2027-10	73,8	3,0	-10,4	285,8	10,8	NA	NA
2027-11	66,7	4,2	-17,0	283,9	17,5	96C	Violeta-azul
2027-12	72,7	1,8	-12,2	278,2	12,3	NA	NA

NA: No se puede analizar o medir

*Valor medio (n=23)

[0036]

[Ejemplo 2: Introducción de pB423 en variedad de crisantemo “*Sei Arabella*” (No. de línea T34)(coexpresión del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se creó pB423 plásmido (pBCtA3’5’GT+CamF3’5’H) de acuerdo con el ejemplo 1.

[0037]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó una variedad de crisantemo decorativo mediano de color rosa salmón “*Sei Arabella*” (Inochio Seikoen, No. de línea T34) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB423 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 47 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se confirmó una alteración del color de la flor hacia el azul en 34 líneas (72%). En 27 de las líneas, se confirmó la acumulación de 3’, 5’-diglucósido de 3-(6’’-malonil)glucósido de delphinidina (ternatina C5) y 3,3’,5’-triglucósido de delphinidina (preternatina C5) como las antocianinas principales. Los colores de las flores en estas líneas se modificaron a los

colores del grupo azul o del grupo violeta-azul en la tabla de colores RHS. Se obtuvieron crisantemos azules a una alta proporción del 72% con “*Sei Arabella*”, similar al “*Taihei*”. A continuación en la Tabla 2, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 2]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Sei Arabella Tipo silvestre*	77,7	15,0	-1,4	354,6	15,1	73A-B	Rojo-morado
Transformantes de Sei Arabella							
1916-01	65,3	2,3	-14,3	279,1	14,5	97A	Violeta-azul
1916-02	52,4	2,6	-21,4	276,9	21,5	95C, 97A	Violeta-azul
1916-03	62,2	15,1	-13,5	318,3	20,3	84A	Violeta
1916-04	46,6	5,9	-25,9	282,8	26,6	95C	Violeta-azul
1916-05	55,0	5,1	-18,3	285,4	19,0	92B	Violeta-azul
1916-06	67,3	3,4	-11,5	286,6	12,0	92B-C	Violeta-azul
1916-10	45,4	32,3	-22,9	324,7	39,6	N81A-B	Morado-violeta
1916-12	56,9	5,9	-17,3	289,0	18,3	94B	Violeta-azul
1916-15	57,8	1,9	-16,7	276,6	16,8	97A-B	Violeta-azul
1916-16	44,9	30,6	-23,2	322,9	38,4	N81B-C	Morado-violeta
1916-17	57,6	3,0	-22,9	277,5	23,1	96D	Violeta-azul
1916-18	66,6	1,5	-7,3	281,6	7,4	85B	Violeta
1916-19	60,7	4,2	-19,6	282,1	20,0	95C	Violeta-azul
1916-20	51,9	3,4	-21,3	279,2	21,6	95C-D	Violeta-azul
1916-21	72,2	3,0	-7,5	291,7	8,1	91C	Violeta-azul
1916-22	56,8	2,0	-18,7	276,1	18,8	95C-D	Violeta-azul
1916-23	52,7	4,4	-23,8	280,6	24,3	100B-C	Azul
1916-24	69,3	1,7	-9,7	280,1	9,9	92C	Violeta-azul
1916-26	59,9	1,5	-15,8	275,5	15,9	96D	Violeta-azul
1916-27	50,9	2,8	-23,2	276,8	23,4	96D	Violeta-azul
1988-02	78,3	-2,6	-0,2	274,0	2,6	95D	Violeta-azul
1988-01	64,3	13,6	-11,3	320,1	17,7	84A	Violeta
2072-02	72,2	-0,8	-7,6	263,9	7,7	NA	NA
2072-04	62,5	-1,8	-16,1	263,6	16,2	NA	NA
2072-05	75,1	-1,2	-8,8	442,3	8,9	NA	NA
2072-06	68,0	-0,5	-12,8	267,6	12,8	NA	NA
2072-10	65,3	13,8	-6,6	334,6	15,3	NA	NA
2072-14	57,3	1,9	-22,1	274,9	22,2	NA	NA
2072-17	61,7	-0,3	-16,0	268,9	16,0	NA	NA
2072-18	68,8	2,1	-7,7	285,4	8,0	NA	NA
2072-25	66,0	0,1	-12,2	270,6	12,2	NA	NA
2072-26	58,4	0,2	-17,9	270,8	17,9	NA	NA
2072-29	71,2	5,5	-6,2	311,2	8,3	NA	NA
2072-30	67,8	0,2	-10,9	271,0	10,9	NA	NA

NA: No se puede analizar o medir

[0038]

[Ejemplo 3: Introducción de pB423 en línea de crisantemo “T37” (coexpresión del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador

de *Agrobacterium nos*, y el gen F3'5'H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se creó pB423 plásmido (pBCtA3'5'GT+CamF3'5'H) de acuerdo con el ejemplo 1.

[0039]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó una línea de crisantemo de pompón pequeño de color rosa “T37” (línea de reproducción muestreada suministrada por Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB423 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 97 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se confirmó una alteración del color de la flor hacia el azul en 58 líneas (60%). Con el uso de 9 de las líneas, se confirmó la acumulación de 3', 5'-diglucósido de 3-(6"-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y 3,3',5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5) como las antocianinas principales. Sus colores de flores se modificaron al grupo violeta-azul. Se obtuvieron crisantemos azules a una alta proporción del 60% con “T37”, similar a “*Taihei*” y “*Sei Arabella*”. A continuación en la Tabla 3, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 3]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
T37 Tipo silvestre*	48,9	38,9	-14,1	340,1	41,4	N74B	Rojo-morado
Transformantes de T37							
1921-01	47,9	9,8	-19,3	297,0	21,7	94B-C	Violeta-azul
1921-02	45,7	10,3	-22,1	295,1	24,4	93C-D	Violeta-azul
1921-03	50,8	8,5	-22,5	290,8	24,1	96B	Violeta-azul
1921-04	58,4	3,7	-17,8	281,7	18,1	96C	Violeta-azul
1921-05	44,8	6,1	-22,9	285,0	23,7	96B-C	Violeta-azul
1921-06	55,4	5,4	-16,4	288,4	17,3	93C-D	Violeta-azul
1939-01	51,1	20,9	-16,6	321,5	26,7	N81B	Morado-violeta
1939-02	50,0	5,6	-21,3	284,8	22,0	96B	Violeta-azul
1939-03	42,3	8,1	-24,4	288,3	25,7	96B	Violeta-azul
1939-04	50,7	6,8	-23,2	286,2	24,2	96B	Violeta-azul
1972-03	57,4	5,5	-18,1	287,0	18,9	96C-D	Violeta-azul
1972-05	86,7	-0,1	2,0	93,5	2,0	91D	Violeta-azul
1989-01	61,7	19,1	-12,9	325,9	23,1	84A	Violeta

1989-02	64,1	4,9	-13,1	290,4	14,0	92C	Violeta-azul
1990-05	56,8	4,8	-16,8	286,0	17,5	96D	Violeta-azul
2013-03	56,3	6,2	-18,9	288,1	19,9	96D	Violeta-azul
2013-04	63,7	4,1	-14,2	286,2	14,8	96D	Violeta-azul
2013-06	69,4	1,5	-12,1	276,9	12,1	97A	Violeta-azul
2013-07	68,3	1,0	-11,4	275,2	11,5	96C	Violeta-azul
2013-08	65,1	0,1	-12,1	270,3	12,1	96C	Violeta-azul
2018-01	67,2	3,9	-11,1	289,2	11,8	94D	Violeta-azul
2018-02	70,6	5,5	-9,8	299,4	11,2	91B	Violeta-azul
2018-03	72,7	4,6	-9,1	296,9	10,2	91C	Violeta-azul
2018-04	69,6	6,5	-9,9	303,1	11,8	85A-B	Violeta
2018-05	73,8	6,4	-7,3	310,9	9,7	85B-C	Violeta
2018-06	57,5	2,2	-17,4	277,1	17,5	96B	Violeta-azul
2018-08	63,2	4,7	-10,8	293,5	11,8	91B	Violeta-azul
2018-09	71,3	2,3	-10,1	282,8	10,4	93D	Violeta-azul
2018-10	64,2	3,3	-14,9	282,5	15,3	92B	Violeta-azul
2018-11	64,5	3,4	-15,6	282,3	16,0	96D	Violeta-azul
2018-12	62,9	4,8	-11,9	292,1	12,8	91A-B	Violeta-azul
2018-13	72,9	7,4	-3,3	335,8	8,1	84B-C	Violeta
2018-14	59,1	7,8	-13,1	300,6	15,3	92B-C	Violeta-azul
2018-15	67,6	3,6	-8,7	292,8	9,4	92C	Violeta-azul
2036-02	52,5	8,7	-20,0	293,4	21,8	NA	NA
2036-05	64,4	5,3	-4,1	322,8	6,7	92C	Violeta-azul
2036-06	75,2	5,3	-7,7	304,5	9,4	85C	Violeta
2036-11	60,2	4,2	-17,7	283,4	18,2	97AB	Violeta-azul
2036-14	50,1	8,6	-20,5	292,7	22,2	NA	NA
2036-15	70,1	3,6	-12,5	286,0	13,0	94D	Violeta-azul
2036-19	61,3	5,1	-16,5	287,1	17,3	NA	NA
2036-20	67,3	3,9	-12,8	286,9	13,4	96D	Violeta-azul
2036-24	66,1	3,3	-14,3	283,0	14,7	96D	Violeta-azul
2036-27	70,3	2,8	-11,2	284,2	11,5	92CD	Violeta-azul
2036-32	68,0	7,0	-11,5	301,3	13,4	N88C	Violeta
2036-33	63,8	4,8	-15,5	287,2	16,2	93D	Violeta-azul
2036-36	61,0	6,5	-17,2	290,6	18,4	94C-D	Violeta-azul
2047-02	65,3	7,9	-11,1	305,5	13,6	85A	Violeta
2047-03	58,2	5,0	-19,3	284,6	19,9	96C-D	Violeta-azul
2047-04	62,8	3,6	-14,7	283,8	15,1	NA	NA
2047-05	51,2	11,8	-20,9	299,5	24,0	92A-90C	Violeta-azul
2047-07	54,0	13,2	-15,9	309,7	20,7	90C-92A	Violeta-azul
2047-08	63,9	5,9	-13,6	293,3	14,8	94C-D	Violeta-azul
2047-09	57,1	5,1	-20,8	283,6	21,4	97A	Violeta-azul
2047-10	54,3	7,4	-22,5	288,1	23,7	96C-D	Violeta-azul
2047-11	60,8	9,5	-16,2	300,4	18,8	90D	Violeta-azul
2047-12	59,0	5,8	-15,8	290,2	16,8	94C	Violeta-azul
2047-15	63,9	13,5	-11,3	320,1	17,6	76A	Morado

NA: No se puede analizar o medir

[0040]

[Ejemplo 4: Introducción de pB425 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP, y el gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*]

[1] Ensamblaje de vectores

Se construyó el vector binario que expresa F3'5'H de campánula pB315 (pBCam2) para la unión de múltiples casetes de inhibición/expresión de genes, un casete de inhibición de F3'H de crisantemo y casetes de expresión CtAGS, CtA3'5'GT y DFR. Se unió un fragmento de ADN de vector binario obtenido mediante digestión de pBI121-FASS-CmF3H1k con SpeI y EcoICRI, con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb que se obtuvo mediante digestión de un producto de digestión KpnI de pCR ADHNF-Campanula F3'5'H (patente japonesa No. 5697040) con XbaI después de despuntar los extremos, con el fin de obtener pB315 (pBI121-FASS-CmF3Hpro1k:NtADH-5'UTR-Campanula F3'5'H:NOSter; pBCam2).

[0041]

Se unió un fragmento de ADN obtenido mediante digestión de pBSII-ADH-CtA3'5'GT obtenido en el ejemplo de referencia 1 con NheI y EcoICRI, con un fragmento de vector que se obtuvo mediante digestión de pMCE5-2 (FASS-CmF3Hp-AtHSpt) con NheI y EcoICRI, con el fin de obtener pMCE5-2 ADHNF-CtA3'5'GT. Se unió un casete CmF3Hp1k:ADHNF-CtA3'5'GT:AtHSpt obtenido mediante digestión de pMCE5-2 ADHNF-CtA3'5'GT con FseI y PmeI, con un fragmento de ADN de vector binario que se obtuvo mediante digestión de pB315 con FseI y SwaI, con el fin de obtener pB425 (pBCam2+CtA3'5'GT).

[0042]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* transferido con pB425 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 42 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se encontró en 23 líneas (55%) una alteración del color de la flor hacia el azul. En 11 de las líneas (26% del total), se exhibió color azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$. En 12 líneas (29% del total), se exhibió el color de la flor en el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS. En las líneas con el rasgo de flor azul, se confirmó acumulación de las antocianinas principales 3', 5'-diglucósido de 3-(6"-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y 3,3',5'-triglucósido de delfinidina

(preternatina C5). Por lo tanto, se puede crear crisantemo azul mediante la expresión de dos genes, el gen A3'5'GT derivado de clitoria y el gen F3'5'H derivado de campánula. A continuación en la Tabla 4, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 4]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1729-08	72,9	3,2	-10,8	286,3	11,3	94B	Violeta-azul
1729-09	76,7	3,2	-6,1	297,3	6,9	85C	Violeta
1729-11	76,6	6,1	-6,8	311,8	9,1	94D	Violeta-azul
1729-12	65,2	4,7	-19,7	283,5	20,3	97B	Violeta-azul
1729-14	77,7	1,1	-6,9	279,0	7,0	97B-C	Violeta-azul
1729-17	79,2	1,0	-3,4	285,9	3,5	94D	Violeta-azul
1729-18	69,5	5,2	-11,3	294,6	12,5	85B	Violeta
1729-19	75,9	2,9	1,4	361,4	3,2	92D	Violeta-azul
1729-24	61,9	4,2	-19,9	282,0	20,3	97A/96D	Violeta-azul
1729-25	76,9	0,6	-3,1	280,3	3,2	85C-D	Violeta
1729-26	83,2	1,6	2,0	411,5	2,5	85D	Violeta
1729-27	66,0	4,1	-17,2	283,5	17,6	96D	Violeta-azul
1729-28	75,4	3,5	-6,3	298,9	7,1	85C	Violeta
1729-29	77,6	8,1	-3,9	334,1	9,0	N80D	Morado-violeta
1729-33	79,5	2,8	-2,3	321,5	3,6	NA	NA
1729-37	71,9	2,6	-4,3	301,0	5,0	85C	Violeta
1729-38	81,8	3,6	-2,8	322,3	4,6	NA	NA
1729-39	69,1	0,8	-9,3	275,2	9,3	95D	Violeta-azul
1729-40	72,0	-0,2	-9,3	269,1	9,3	97A-B	Violeta-azul
1729-41	65,7	2,7	-14,7	280,4	15,0	96C-D	Violeta-azul
1729-44	68,6	5,5	-7,8	305,1	9,5	85A-B	Violeta
1729-45	66,9	4,6	-13,8	288,4	14,5	92A-B	Violeta-azul
1729-46	72,7	6,3	-8,3	306,9	10,4	85A	Violeta

*Valor medio (n=23)

NA: No se puede analizar o medir

[0043]

[Ejemplo 5: Introducción de pB423 en variedad de crisantemo “Taihei” (coexpresión del gen A3'5'GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3'5'H de campánula y el gen del iris holandés DFR (Dutch iris DFR) bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se combinaron y utilizaron como patrones un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pSPB909 plásmido, el cual contiene el gen DFR derivado del

lóbulo del perianto del iris holandés (*Iris hollandica*) (Plant Cell Physiol 48 (2007) 1589, AB332098) como patrón, y el IrisDFR_ADH_ORF_Fd (5'-CAAGAAAAATAAATGATGAGCCCCGTTGTC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con IhDFR, SEC ID NO: 12) y el IrisDFR_NdeI Rv (5'-CATATGTACCTCCCGTTCGCTTC- 3'; SEC ID NO: 13) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pBI221 ADH-221 como patrón, y el XbaI- ADH-Fd (5'-ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 14) y el IrisDFR_ORF_ADH_Rv (5'- GGGGCTCATCATTTATTTTCTTGATTTCCTTCAC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb, SEC ID NO: 15) como cebadores, con el XbaI-ADH-Fd (5'-ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con el NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 14) y el IrisDFR_NdeI Rv (5'-CATATGTACCTCCCGTTCGCTTC-3'; SEC ID NO: 13) como cebadores, para que la PCR amplifique un fragmento de ADN que comprende ADH-5'UTR 94 pb de tabaco unido directamente al codón de inicio del gen DFR del iris holandés, y el fragmento fue clonado en pCR-bluntII-TOPO para obtener pCR-ADHNF-IhDFR-5'. Se unió un fragmento de ADN obtenido mediante digestión de este plásmido con SalI y EcoRV y un fragmento de ADN plasmídico obtenido mediante digestión de pSPB909 con SalI y EcoRV, con el fin de obtener pUC El2-35Sp:ADHNF-IrisDFR:D8t. Se unió un fragmento de ADN obtenido al despuntar los extremos del producto de digestión XhoI de este plásmido y luego mediante digestión con NheI y un fragmento de ADN plasmídico obtenido mediante digestión de pMCE5-2 con NheI y EcoICRI, con el fin de obtener pMCE5-2 ADHNF-IhDFR. Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de pMCE5-2-ADHNF-IhDFR con AscI y PmeI, con un fragmento de ADN de vector binario pB423 obtenido mediante digestión con AscI y SwaI, con el fin de obtener pB433 (pBCtA3'5'GT+CamF3'5'H+IhDFR).

[0044]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB433 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo

mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 55 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, de las 39 líneas (71%) en las que se encontró alteración del color de la flor hacia el azul, 31 líneas (56% del total) exhibieron color azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$. En 33 líneas (60% del total), se exhibió el color de la flor en el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS. En las líneas con el rasgo de flor azul, se confirmó acumulación de las antocianinas principales 3', 5'-diglucósido de 3-(6"-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y 3,3',5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5). Al utilizar el terminador de *Arabidopsis* HSP como el terminador para el gen F3'5'H derivado de campánula, se creó crisantemo azul en una proporción mayor que cuando se utiliza el terminador de *Agrobacterium nos* (ejemplos 4, 12-18). A continuación en la Tabla 5, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 5]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1737-01	53,2	6,8	-23,9	285,9	24,8	96A-B	Violeta-azul
1737-03	63,6	5,8	-18,6	287,4	19,5	94B-C	Violeta-azul
1737-04	57,4	3,9	-19,9	281,1	20,3	96B-C	Violeta-azul
1737-05	62,1	5,0	-20,6	283,6	21,2	96B-C	Violeta-azul
1737-06	80,2	3,9	-5,1	307,4	6,4	85B-C	Violeta
1737-07	53,6	7,4	-27,4	285,0	28,3	96B-C	Violeta-azul
1737-08	49,7	8,4	-28,7	286,4	29,9	96B-C	Violeta-azul
1737-10	64,8	10,4	-15,1	304,4	18,3	90C	Violeta-azul
1737-11	63,7	4,6	-17,8	284,6	18,4	96C-D	Violeta-azul
1737-12	58,8	3,9	-19,4	281,3	19,8	96B	Violeta-azul
1737-13	62,7	5,8	-18,0	287,7	18,9	NA	NA
1737-17	70,4	3,3	-14,8	282,5	15,2	96C-D	Violeta-azul
1737-18	72,3	4,0	-11,2	289,6	11,9	92A-B	Violeta-azul
1737-19	53,2	7,9	-30,3	284,7	31,3	96B	Violeta-azul
1737-24	62,5	3,3	-19,7	279,5	20,0	95C	Violeta-azul
1737-25	66,5	3,3	-17,2	280,9	17,5	96C-D	Violeta-azul
1737-26	57,4	3,2	-20,0	279,1	20,3	95C	Violeta-azul
1737-28	61,2	4,1	-22,1	280,6	22,4	95C	Violeta-azul
1737-29	55,7	7,5	-22,6	288,3	23,8	96A-B	Violeta-azul
1737-30	65,5	1,3	-17,4	274,3	17,4	97A-B	Violeta-azul
1737-36	59,4	6,0	-22,5	284,9	23,2	96B	Violeta-azul

1737-38	61,3	8,1	-23,0	289,3	24,3	94B	Violeta-azul
1737-41	61,0	5,5	-20,8	284,7	21,5	96B	Violeta-azul
1737-42	61,7	4,8	-18,3	284,6	18,9	94B	Violeta-azul
1737-44	63,6	9,0	-19,1	295,2	21,1	93C	Violeta-azul
1737-45	66,5	1,2	-10,9	276,4	10,9	97A-B	Violeta-azul
1737-47	59,9	4,5	-20,0	282,6	20,5	96D	Violeta-azul
1737-48	59,6	6,8	-20,1	288,7	21,2	96B-C	Violeta-azul
1737-50	79,5	3,4	-4,5	307,3	5,6	85C-D	Violeta
1737-51	59,9	5,3	-6,8	308,1	8,6	96D	Violeta-azul
1737-53	36,9	11,1	-36,0	287,1	37,7	95B-C	Violeta-azul
1737-54	78,5	3,1	-5,0	302,3	5,9	N82D	Violeta
1737-55	72,1	3,9	-5,2	306,7	6,5	N88C	Violeta
1737-56	57,2	5,6	-23,3	283,4	24,0	95B-C	Violeta-azul
1737-57	81,8	1,1	-3,8	285,9	3,9	91C-D	Violeta-azul
1737-58	58,9	4,8	-20,0	283,6	20,5	95C	Violeta-azul
1737-59	50,2	8,3	-28,1	286,5	29,3	96B	Violeta-azul
1737-61	71,1	6,3	-13,6	295,0	15,0	N88C	Violeta
1737-62	53,7	4,4	-22,2	281,3	22,6	95C	Violeta-azul

*Valor medio (n=23)

NA: No se puede analizar o medir

[0045]

[Ejemplo 6: Introducción de pB423 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3’5’H de campánula y el gen DFR de *Delphinium* bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se combinaron y utilizaron como patrones un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pDbDFR4-8 plásmido (número de acceso GenBank AB221083) que contiene un gen DFR derivado del sépalo de *Delphinium* (*Delphinium x belladonna*, “Volkerfrieden”) como patrón, y el DbDFR_ADH_ORF_Fd (5’-CAAGAAAAATAAATGACTGTAGAACTGTTTGTG-3’; el subrayado indica la secuencia que se alinea con DbDFR, SEC ID NO: 16) y el DbDFR_NcoI_Rv (5’-CCATGGTGTACTTATAGTTGAATCC-3’; SEC ID NO: 17) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pBI221 ADH-221 como patrón, y el XbaI-ADH-Fd (5’-ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3’; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5’UTR 94 pb; SEC ID NO: 14) y el DbDFR_ORF_ADH_Rv (5’-TTCTACAGTCATTTATTTTCTTGATTTCCTTCAC-3’; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5’UTR 94 pb; SEC ID NO: 18) como cebadores, para PCR con el uso del XbaI-ADH-Fd (5’-

ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 14) y el DbDFR_NcoI_Rv (5'-CCATGGTGTACTTATAGTTGAATCC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 17) como cebadores y el PrimeStar (Takara Bio, Inc.) como ADN polimerasa, con el fin de obtener un fragmento de ADN que comprende ADH-5'UTR 94 bp de tabaco unido directamente al codón de inicio del gen DFR de *Delphinium*. Después de llevar a cabo la reacción para añadir dA al producto de amplificación de extremos despuntados, se utilizó para la clonación de TA en pCR2.1 (Invitrogen) para obtener pCR-ADHNF-DbDFR-5'. Se unió un fragmento obtenido mediante digestión de este plásmido con SmaI y NcoI, con un fragmento de ADN plasmídico obtenido mediante digestión de pDbDFR4-8 con SmaI y NcoI, con el fin de obtener pBS-ADHNF-DbDFR. Se unió un fragmento de ADN obtenido al despuntar los extremos del producto de digestión XhoI de este plásmido y luego mediante digestión con SpeI y un fragmento de ADN plasmídico obtenido mediante digestión de pMCE5-2 con NheI y EcoICRI, con el fin de obtener pMCE5-2 ADHNF-DbDFR. Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de pMCE5-2 ADHNF-DbDFR con AscI y PmeI, con un fragmento de ADN de vector binario pB423 obtenido mediante digestión con AscI y SmaI, con el fin de obtener pB434 (pBCtA3'5'GT+CamF3'5'H+DbDFR).

[0046]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB434 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 12 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, de las 8 líneas (67%) en las que se encontró alteración del color de la flor hacia el azul, 8 líneas (67% del total) exhibieron color azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$. Siete líneas (58% del total) exhibieron el color de la flor en el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS. En las líneas con el rasgo de flor azul, se confirmó acumulación de las antocianinas principales 3', 5'-diglucósido de 3-(6"-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y

3,3',5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5). Al utilizar el terminador de *Arabidopsis* HSP como el terminador para el gen F3'5'H derivado de campánula, se creó crisantemo azul en una proporción mayor que cuando se utiliza el terminador de *Agrobacterium nos* (ejemplos 4, 12-18). A continuación en la Tabla 6, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 6]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1744-02	62,8	2,3	-14,7	278,7	14,9	NA	NA
1744-03	62,7	2,6	-12,9	281,4	13,1	96D	Violeta-azul
1744-07	65,9	0,2	-15,4	270,8	15,4	97A-B	Violeta-azul
1744-08	56,6	5,9	-25,7	282,9	26,4	96B	Violeta-azul
1744-09	55,3	7,8	-22,4	289,2	23,7	94B	Violeta-azul
1744-14	66,1	3,4	-14,9	282,7	15,3	92A-B	Violeta-azul
1744-19	62,9	1,9	-16,8	276,3	16,9	97A	Violeta-azul
1753-03	65,1	2,7	-18,4	278,3	18,6	97A	Violeta-azul

*Valor medio (n=23)

NA: No se puede analizar o medir

[0047]

[Ejemplo 7: Introducción de pB435 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen A3'5'GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3'5'H de campánula y el gen DFR de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se combinaron y utilizaron como patrones un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pBSCtDFR20 plásmido (número de acceso GenBank AB185901) que contiene un gen DFR derivado de pétalos de clitoria (*Clitoria ternatea* “azul doble”) como patrón, y el CtDFR_ADH_ORF_Fd (5'-CAAGAAAAATAAATGGATTTCAGCAGCTGAAGTG-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con CtDFR, SEC ID NO: 19) y el DCtDFR_SphI_Rv (5'-GCATGCTCTCATTATGTCAAG-3'; SEC ID NO: 20) como cebadores, y un fragmento

de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pBI221 ADH-221 como patrón, y el XbaI- ADH-Fd (5'-ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 14) y el CtDFR_ORF_ADH_Rv (5'- TGCTGAATCCATTTATTTTTCTTGATTTCCTTCAC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 21) como cebadores, para PCR con el uso del XbaI-ADH-Fd (5'-ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 14) y el CtDFR_SphI_Rv (5'-GCATGCTCTCATTATGTCAAG-3'; SEC ID NO: 20) como cebadores y el PrimeStar (Takara Bio, Inc.) como ADN polimerasa, con el fin de obtener un fragmento de ADN que comprende ADH-5'UTR 94 bp de tabaco unido directamente al codón de inicio del gen DFR de clitoria. Después de llevar a cabo la reacción para añadir dA al producto de amplificación de extremos despuntados, se utilizó para la clonación de TA en pCR2.1 (Invitrogen) para obtener pCR-ADHNF-CtDFR-5'. Se unió un fragmento obtenido mediante digestión de este plásmido con XbaI y SphI, con un fragmento de ADN plasmídico obtenido mediante digestión de pBSCtDFR20 con XbaI y SphI, con el fin de obtener pBS-ADHNF-CtDFR. Se unió un fragmento de ADN (090616-2) obtenido al despuntar los extremos del producto de digestión XhoI de este plásmido y luego mediante digestión con XbaI y un fragmento de ADN plasmídico obtenido mediante digestión de pMCE5-2 con NheI y EcoICRI, con el fin de obtener pMCE5-2 ADHNF- CtDFR. Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de pMCE5-2 ADHNF-CtDFR con AscI y PmeI, con un fragmento de ADN de vector binario pB423 obtenido mediante digestión con AscI y SwaI, con el fin de obtener pB435 (pBCtA3'5'GT+CamF3'5'H+CtDFR).

[0048]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB435 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 34 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se

encontró en 28 líneas (82%) una alteración del color de la flor hacia el azul. 23 líneas (68% del total) exhibieron un azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$, y 22 líneas (65% del total) exhibieron el color de la flor en el grupo azul o el grupo violeta-azul mediante medición con la tabla de colores RHS. En las líneas con el rasgo de flor azul, se confirmó acumulación de las antocianinas principales 3', 5'-diglucósido de 3-(6"-malonil)glucósido de delphinidina (ternatina C5) y 3,3',5'-triglucósido de delphinidina (preternatina C5). Al utilizar el terminador de *Arabidopsis* HSP como el terminador para el gen F3'5'H derivado de campánula, se creó crisantemo azul en una proporción mayor que cuando se utiliza el terminador de *Agrobacterium nos* (ejemplos 4, 12-18). A continuación en la Tabla 7, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 7]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1745-01	61,7	1,4	-18,9	274,2	18,9	95B-C	Violeta-azul
1745-02	67,1	2,0	-15,3	277,4	15,5	97A-B	Violeta-azul
1745-03	49,5	7,1	-29,6	283,6	30,4	99B-C	Azul
1745-04	52,1	7,8	-28,7	285,2	29,8	96B-C	Violeta-azul
1745-06	52,0	5,2	-25,1	281,7	25,6	95C	Violeta-azul
1745-07	58,3	4,9	-22,3	282,5	22,8	96B-C	Violeta-azul
1745-09	63,6	7,1	-16,9	292,7	18,4	N88B	Violeta
1745-10	57,3	6,8	-26,9	284,1	27,8	95C	Violeta-azul
1745-11	61,0	4,7	-22,6	281,9	23,1	95C	Violeta-azul
1745-12	48,4	20,0	-22,1	312,2	29,8	N87A-B	Violeta
1745-13	67,7	8,7	-14,1	301,7	16,6	90C-D	Violeta-azul
1745-14	48,3	7,1	-27,2	284,6	28,1	96C	Violeta-azul
1745-15	52,4	7,9	-27,2	286,1	28,3	96A-B	Violeta-azul
1745-16	64,7	3,1	-17,5	279,9	17,8	96B-C	Violeta-azul
1745-19	65,5	4,8	-16,3	286,4	17,0	92B	Violeta-azul
1745-20	59,2	4,8	-21,5	282,5	22,1	96B-C	Violeta-azul
1745-22	NA	NA	NA	NA	NA	85A-B	Violeta
1745-23	59,0	6,4	-20,3	287,5	21,3	92A	Violeta-azul
1745-28	65,5	3,0	-9,6	287,3	10,1	85B	Violeta
1745-29	60,4	3,9	-20,1	281,0	20,5	95C	Violeta-azul
1754-01	59,6	4,7	-19,8	283,5	20,4	96B-C	Violeta-azul
1754-02	66,8	6,5	-11,0	300,7	12,8	N88C	Violeta
1754-03	58,9	3,6	-19,2	280,6	19,6	96C-D	Violeta-azul
1754-05	57,7	3,7	-19,3	280,8	19,7	96C	Violeta-azul
1754-06	64,8	1,8	-14,9	277,0	15,0	96C	Violeta-azul
1754-09	51,0	5,0	-21,2	283,2	21,8	96B	Violeta-azul
1754-10	71,3	2,1	-10,5	281,1	10,7	NA	NA
1754-11	55,4	3,5	-19,7	280,1	20,0	96C-D	Violeta-azul

*Valor medio (n=23)

NA: No se puede analizar o medir

[0049]

[Ejemplo 8: Introducción de pB428 en variedad de crisantemo “*Sei Shawl*” (variedad muestreada suministrada por Inochio Seikoen; No. de línea S39) (Inhibición del gen F3’H endógeno de crisantemo bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y la coexpresión del gen F3’5’H de campánula y del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se utilizó F3’H ORF de crisantemo amplificado mediante PCR con el uso de ADNc derivado de “*Arietta*” ray florets (flor ligulada) de crisantemo como patrón, el CmF3’H_full_ORF_F (5’- ATGAACATTTTACCTTTCGTATTTTATG-3’; SEC ID NO: 22) y el CmF3’H_full_ORF_R (5’-TTAAATACTTTTCATATACGTGGG-3’, SEC ID NO: 23) como cebadores y LA Taq como ADN polimerasa, para la clonación de TA en pCR2.1 para obtener pCR2.1-CmF3’H-ORF1. Se unió un fragmento de ADN (SEC ID NO: 38) que sirve como un activador de iARN, amplificado mediante PCR con el uso del plásmido antes mencionado como patrón, y el CmF3’H_3’-Fd para ARNds (5’- CACCCCGAACTCATTCGTCATCCAC-3’; SEC ID NO: 24) y el CmF3’H_3’-Rv para ARNds (5’-TCAATCCATACGCTTCTTCCATG-3’; SEC ID NO: 25) como cebadores, con pENTR-D/TOPO (Invitrogen) para obtener pENTR-CmF3’HC. La reacción de LR se llevó a cabo con pENTR-CmF3’H-C y pANDA35K (http://bsw3.naist.jp/simamoto/pANDA/real/pANDA_top.htm) para obtener pANDA-CmF3’H-C IR. Se unió un fragmento de ADN de aproximadamente 2,5 kb obtenido mediante digestión de este plásmido con XbaI y EcoICRI, con un fragmento de ADN de vector binario obtenido mediante digestión de pBI121-FASS-CmF3H1k con SpeI y EcoICRI, con el fin de obtener pB319(pBF3’H-Ci).

Se unió un fragmento de ADN plasmídico obtenido mediante digestión de pMCE5-2 con NheI y EcoICRI, con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb que se obtuvo al despuntar los extremos de un producto de digestión KpnI de pCR ADHNF-Campanula F3’5’H (patente japonesa No. 5697040), y luego se digirió con XbaI, con el fin de obtener pMCE5-2 ADHNF-CamF3’5’H. Se unió un casete de expresión obtenido

mediante digestión de este plásmido con FseI y PmeI, con un fragmento de vector binario de pB319 obtenido mediante digestión FseI y SwaI, con el fin de obtener pB332 (pBF3'H-Ci+CamF3'5'H).

[0050]

Se unió un fragmento de ADN de vector binario obtenido mediante digestión de pB332 (pBF3'H-Ci+CamF3'5'H) con FseI y SwaI, con un casete CmF3Hp1k:ADHNF-CtA3'5'GT:AtHSPT obtenido mediante digestión de pMCE5-2 ADHNF-CtA3'5'GT con FseI y PmeI, con el fin de obtener pB428 (pBF3'H-Ci+CamF3'5'H+CtA3'5'GT).

[0051]

Se transformó la variedad de crisantemo decorativo grande de color rosa “*Sei Shawl*” (variedad suministrada por Inochio Seikoen; No. de línea S39) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB428 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 10 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se confirmó la alteración del color de la flor hacia el azul en 6 líneas (60%), mientras que en 3 líneas (30% del total), se confirmó la acumulación de 3', 5'-diglucósido de 3-(6"-malonil)glucósido de delphinidina (ternatina C5) y 3,3',5'-triglucósido de delphinidina (preternatina C5), y el color de la flor se modificó al grupo azul o al grupo violeta-azul (figura 5). Al utilizar el terminador de *Arabidopsis* HSP como el terminador para el gen F3'5'H derivado de campánula, se creó crisantemo azul en una proporción mayor que cuando se utiliza el terminador de *Agrobacterium nos* (ejemplos 4, 12-18). A continuación en la Tabla 8, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 8]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
S39 Tipo silvestre*	70,6	24,0	-4,8	348,6	24,5	73B	Rojo-morado
Transformantes de S39							
1870-01	66,1	4,3	-12,7	288,8	13,4	93C	Violeta-azul
1870-02	75,7	0,7	-9,5	274,5	9,5	100D	Azul
1891-01	66,3	6,6	-12,3	298,1	14,0	85B	Violeta
1891-02	58,8	4,8	-19,1	284,0	19,7	96D	Violeta-azul
1891-03	69,1	10,6	-6,7	327,7	12,6	N82C	Morado-violeta
1891-04	66,1	14,6	-10,5	324,1	18,0	N81C	Morado-violeta

[0052]

[Ejemplo 9: Introducción de pB428 en línea de crisantemo “T27” (Inhibición del gen F3’H endógeno de crisantemo bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y la coexpresión del gen F3’5’H de campánula y del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

El pB428 plásmido (pBF3’H-Ci+CamF3’5’H+CtA3’5’GT) se construyó de acuerdo con el ejemplo 8.

[0053]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó una línea de crisantemo de pompón pequeño de color rosa “T37” (línea de reproducción muestreada suministrada por Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB428 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 10 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se confirmó una alteración del color de la flor hacia el azul en 6 líneas (60%). En 4 de las líneas (40% del total) (figura 5), se confirmó la acumulación de 3’, 5’-diglucósido de 3-(6’’-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y 3,3’,5’-triglucósido de delfinidina (preternatina C5) como las antocianinas principales. Los colores de sus flores en estas líneas se modificaron al grupo violeta-azul. Al utilizar el terminador de *Arabidopsis* HSP como el terminador para el gen F3’5’H derivado de campánula, se creó crisantemo azul en una proporción mayor que cuando se utiliza el terminador de *Agrobacterium nos* (ejemplos 4, 12-18). A continuación en la Tabla 9, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 9]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
T27 Tipo silvestre*	74,2	14,7	-3,3	347,5	15,1	N74C	Rojo-morado

Transformantes de T27							
1805-01	76,2	1,9	-1,2	327,6	2,2	85D	Violeta
1805-02	80,5	-2,0	6,0	108,9	6,3	85D	Violeta
1872-01	65,2	5,3	-12,8	292,6	13,8	94D	Violeta-azul
1872-03	69,8	2,7	-10,6	284,4	10,9	94D	Violeta-azul
1872-04	67,6	2,5	-12,1	281,6	12,4	96C	Violeta-azul
1872-05	56,2	5,9	-22,0	284,9	22,8	96C	Violeta-azul

[0054]

[Ejemplo 10: Introducción de pB428 en variedad de crisantemo “*Sei Arabella*” (No. de línea T34)(Inhibición del gen F3’H endógeno de crisantemo bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y la coexpresión del gen F3’5’H de campánula y del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

El pB428 plásmido (pBF3’H-Ci+CamF3’5’H+CtA3’5’GT) se construyó de acuerdo con el ejemplo 8.

[0055]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó una variedad de crisantemo decorativo mediano de color rosa salmón “*Sei Arabella*” (Inochio Seikoen, No. de línea T34) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB428 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 3 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se confirmó una alteración del color de la flor hacia el azul en 3 líneas (100%). En 2 de las líneas (67% del total) (figura 5), se confirmó la acumulación de 3’, 5’-diglucósido de 3-(6”-malonil)glucósido de delphinidina (ternatina C5) y 3,3’,5’-triglucósido de delphinidina (preternatina C5) como las antocianinas principales. Los colores de sus flores en estas líneas se modificaron al grupo violeta-azul. Al utilizar el terminador de *Arabidopsis* HSP como el terminador para el gen F3’5’H derivado de campánula, se creó crisantemo azul en una proporción mayor que cuando se utiliza el terminador de *Agrobacterium nos* (ejemplos 4, 12-18). A continuación en la Tabla 10, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 10]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Sei Arabella Tipo silvestre*	84,3	0,4	8,0	87,4	8,0	49C	Rojo
Transformantes de Sei Arabella							
1804-01	70,9	-2,7	-4,4	238,4	5,2	97C	Violeta-azul
1804-02	72,1	7,5	-6,9	317,5	10,2	N82D	Morado-violeta
1804-03	53,5	-2,8	2,3	140,7	3,7	97D	Violeta-azul

[0056]

[Ejemplo 11: Introducción de pB428 en línea de crisantemo “T57” (Inhibición del gen F3’H endógeno de crisantemo bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y la coexpresión del gen F3’5’H de campánula y del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

El pB428 plásmido (pBF3’H-Ci+CamF3’5’H+CtA3’5’GT) se construyó de acuerdo con el ejemplo 8.

[0057]**[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor**

Se transformó la línea de crisantemo decorativo mediano de color rosa salmón “T57” (línea de reproducción muestreada suministrada por Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB428 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvo 1 línea transformante. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se confirmó la alteración del color de la flor hacia el azul y la acumulación de 3’, 5’-diglucósido de 3-(6’’-malonil)glucósido de delphinidina (ternatina C5) y 3,3’,5’-triglucósido de delphinidina (preternatina C5), como antocianinas principales. El color de la flor de esta línea se modificó al grupo violeta-azul, y los valores medidos se muestran en la Tabla 11 a continuación.

[Tabla 11]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
T57 Tipo silvestre*	61,5	31,6	-13,3	337,1	34,2	74B-C	Rojo-morado
Transformantes de T57							
1890-01	56,5	7,3	-22,5	288,0	23,6	94A	Violeta-azul

[0058]

[Ejemplo 12: Introducción de pB436 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen A3’5’GT de clitoria y el gen del iris holandés DFR bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de pMCE5-2 ADHNF-IhDFR obtenido en el ejemplo 5 con *AscI* y *PmeI*, con un fragmento de ADN de vector binario pB425 obtenido mediante digestión con *AscI* y *SwaI*, con el fin de obtener pB436 (pBCam2+CtA3’5’GT+IhDFR).

[0059]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB436 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 57 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se encontró en 32 líneas (56%) una alteración del color de la flor hacia el azul. En 16 líneas (28% del total) se exhibió color azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$ y en 14 líneas (25% del total) se exhibió el color de la flor en el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS. En las líneas con el rasgo de flor azul, se confirmó acumulación de las antocianinas principales 3’, 5’-diglucósido de 3-(6”-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y 3,3’,5’-triglucósido de delfinidina (preternatina C5). A continuación en la Tabla 12, se

muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 12]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,4	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1738-01	81,0	7,1	-0,8	353,9	7,1	84B	Violeta
1738-02	76,6	1,8	-5,9	287,2	6,2	96D	Violeta-azul
1738-03	74,3	6,0	-9,2	303,3	11,0	N82D	Morado-violeta
1738-05	70,6	3,7	-12,5	286,3	13,0	93D	Violeta-azul
1738-06	77,5	4,1	-6,3	302,8	7,5	85B	Violeta
1738-08	69,5	2,7	-11,8	282,9	12,1	91C	Violeta-azul
1738-09	68,1	2,9	-15,4	280,7	15,7	96C-D	Violeta-azul
1738-11	78,8	0,6	-3,3	280,0	3,4	96D	Violeta-azul
1738-12	69,1	4,9	-12,0	292,1	12,9	91B	Violeta-azul
1738-15	77,4	3,8	-6,4	300,9	7,5	85A-B	Violeta
1738-16	70,5	5,8	-11,6	296,4	13,0	N88C-D	Violeta
1738-21	53,2	4,8	-24,6	280,9	25,1	95C	Violeta-azul
1738-23	81,3	2,1	-2,6	309,6	3,4	N88C-D	Violeta
1738-24	71,2	3,1	-11,6	284,9	12,0	91B-C	Violeta-azul
1738-25	77,0	2,8	-7,9	289,3	8,4	85B	Violeta
1738-27	81,1	2,3	-3,9	300,7	4,5	85D	Violeta
1738-28	60,9	3,3	-20,7	279,0	20,9	97A	Violeta-azul
1738-30	58,4	5,9	-16,9	289,2	17,9	94B	Violeta-azul
1738-31	77,6	1,9	-5,5	288,8	5,8	NA	NA
1738-32	70,0	4,9	-9,3	297,6	10,5	N88C-D	Violeta
1738-33	70,8	6,1	-11,3	298,5	12,9	85B	Violeta
1738-35	71,2	5,9	-10,5	299,2	12,0	85B	Violeta
1738-38	68,4	2,0	-8,9	282,8	9,1	NA	NA
1738-41	71,6	2,1	-9,8	282,0	10,0	95D	Violeta-azul
1738-52	74,8	4,1	-7,7	298,0	8,7	85B	Violeta
1738-53	75,3	5,7	-7,4	307,5	9,4	85B-C	Violeta
1738-54	77,3	4,4	-5,2	310,1	6,8	85B	Violeta
1738-57	73,0	4,6	-8,6	298,4	9,7	85B	Violeta
1738-58	67,8	1,5	-12,5	277,0	12,6	95D	Violeta-azul
1738-60	76,9	0,2	-7,6	271,3	7,6	97C	Violeta-azul
1738-62	65,9	1,5	-13,2	276,6	13,3	96C-D	Violeta-azul
1738-63	77,4	3,1	-5,8	298,1	6,6	85B	Violeta-azul

*Valor medio (n=23)

NA: No se puede analizar o medir

[0060]

[Ejemplo 13: Introducción de pB437 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen A3’5’GT de clitoria y el gen *Delphinium* DFR bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de pMCE5-2 ADHNF-DbDFR obtenido en el ejemplo 6 con AscI y PmeI, con un fragmento de ADN de vector binario pB425 obtenido mediante digestión con AscI y SwaI, con el fin de obtener pB437 (pBCam2+CtA3'5'GT+DbDFR).

[0061]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB437 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 38 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se encontró en 21 líneas (55%) una alteración del color de la flor hacia el azul. En 9 líneas (24% del total) se exhibió color azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$ y en 8 líneas (21% del total) se exhibió el color de la flor en el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS. En las líneas con el rasgo de flor azul, se confirmó acumulación de las antocianinas principales 3', 5'-diglucósido de 3-(6"-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y 3,3',5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5). A continuación en la Tabla 13, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 13]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1746-03	68,8	7,0	-12,8	298,8	14,6	N88C	Violeta
1746-08	76,4	1,3	-4,9	284,7	5,1	NA	NA
1746-10	79,5	3,2	-5,2	302,0	6,1	85C	Violeta
1746-11	70,6	4,0	-9,0	294,0	9,9	N82D	Morado-violeta
1746-12	76,2	-0,3	-5,9	267,1	5,9	92C-D	Violeta-azul
1746-13	76,0	1,7	-6,4	285,0	6,7	92C-D	Violeta-azul
1746-23	67,6	3,2	-9,8	287,9	10,3	85B	Violeta
1746-25	76,7	2,8	-4,7	300,7	5,5	85C	Violeta
1745-28	73,5	3,0	-5,1	300,1	5,9	85A-B	Violeta
1746-30	NA	NA	NA	NA	NA	N82D	Morado-violeta

1746-31	71,2	3,8	-10,5	289,8	11,1	92B	Violeta-azul
1746-32	73,9	2,6	-6,1	293,4	6,6	91B	Violeta-azul
1746-34	72,1	3,1	-10,6	286,5	11,1	91B	Violeta-azul
1746-35	72,4	2,5	-9,4	284,7	9,7	92B	Violeta-azul
1746-36	72,5	7,5	-11,2	303,7	13,5	85A	Violeta
1746-37	74,5	11,2	-7,6	325,8	13,5	N80C	Morado-violeta
1746-38	64,8	4,7	-15,1	287,4	15,8	94B	Violeta-azul
1762-03	69,9	2,4	-11,2	282,0	11,5	91B-C	Violeta-azul
1762-06	74,2	7,6	-5,5	324,2	9,3	N80D	Morado-violeta
1762-11	78,9	1,6	-2,8	299,2	3,2	85D	Violeta
1762-17	77,8	5,4	-5,6	313,9	7,8	N88D	Violeta

*Valor medio (n=23)

NA: No se puede analizar o medir

[0062]

[Ejemplo 14: Introducción de pB438 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen A3’5’GT de clitoria y el gen DFR de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de pMCE5-2 ADHNF-CtDFR obtenido en el ejemplo 7 con *AscI* y *PmeI*, con un fragmento de ADN de vector binario pB425 obtenido mediante digestión con *AscI* y *SwaI*, con el fin de obtener pB438 (pBCam2+CtA3’5’GT+CtDFR).

[0063]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB438 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 55 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se encontró en 34 líneas (62%) una alteración del color de la flor hacia el azul. En 13 de las líneas (24% del total), se exhibió color azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$. En 18 líneas (33% del total), se exhibió el color de la flor en el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS. En las líneas con el rasgo de flor azul, se confirmó acumulación de las antocianinas principales 3’, 5’-diglucósido de 3-(6’’-malonil)glucósido de delphinidina

(ternatina C5) y 3,3',5'-triglucósido de delphinidina (preternatina C5). A continuación en la Tabla 14, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 14]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1747-01	71,8	7,2	-8,6	309,6	11,2	N82D	Morado-violeta
1747-02	69,5	2,0	-11,2	280,1	11,4	96D	Violeta-azul
1747-04	64,2	2,2	-14,9	278,6	15,1	96D	Violeta-azul
1747-05	71,8	2,5	-13,6	280,5	13,8	96D	Violeta-azul
1747-07	80,1	0,8	-4,2	280,4	4,3	91B-C	Violeta-azul
1747-08	71,1	7,4	-9,0	309,4	11,7	N82C	Morado-violeta
1747-09	78,0	7,6	-2,9	339,2	8,2	N80D	Morado-violeta
1747-11	74,8	11,9	-7,6	327,5	14,1	N80D	Morado-violeta
1747-13	71,9	4,7	-9,3	296,5	10,4	91A-B	Violeta-azul
1747-14	69,2	8,0	-12,1	303,5	14,5	N88C	Violeta
1747-15	65,2	4,1	-16,7	283,8	17,2	96C-D	Violeta-azul
1747-16	70,1	12,2	-7,5	328,5	14,3	N80C	Morado-violeta
1747-17	66,9	2,6	-11,7	282,3	12,0	92D	Violeta-azul
1747-19	77,0	-0,4	-5,4	274,0	5,4	92C-D	Violeta-azul
1747-22	78,7	5,3	-4,5	319,7	6,9	85A	Violeta
1747-23	72,1	3,9	-9,0	293,3	9,8	N88C	Violeta
1747-24	77,2	4,1	-5,0	309,4	6,4	N82D	Morado-violeta
1747-29	72,4	7,2	-6,7	317,1	9,9	N87C-D	Violeta
1747-34	68,0	4,6	-9,9	295,2	10,9	91A-B	Violeta-azul
1747-35	71,0	1,9	-12,0	279,0	12,2	97A	Violeta-azul
1747-43	67,3	7,0	-10,3	304,2	12,5	85A	Violeta
1747-44	63,2	5,0	-18,6	284,9	19,3	93D	Violeta-azul
1747-45	71,1	3,8	-9,3	292,2	10,0	85D	Violeta
1747-46	60,5	2,4	-16,3	278,5	16,4	96C-D	Violeta-azul
1747-47	75,4	3,6	-7,3	295,9	8,1	85B-C	Violeta
1747-48	65,4	2,8	-13,7	281,7	14,0	96D	Violeta-azul
1747-49	69,5	4,5	-10,1	294,2	11,1	91A-B	Violeta-azul
1747-52	73,5	5,6	-10,6	297,9	12,0	91A	Violeta-azul
1747-53	67,5	3,2	-13,0	283,9	13,4	96D	Violeta-azul
1747-55	62,6	9,7	-17,7	298,6	20,2	92A	Violeta-azul
1747-56	73,5	5,0	-7,8	302,7	9,3	N88D	Violeta
1747-59	71,3	4,2	-8,6	296,1	9,6	85B	Violeta
1747-60	62,4	2,8	-17,8	278,8	18,0	96D	Violeta-azul
1747-63	80,4	5,2	-1,3	345,9	5,4	N81D	Morado-violeta

*Valor medio (n=23)

[0064]

[Ejemplo 15: Introducción de pB426 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen F3'5'H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen *Delphinium* DFR y el gen A3'5'GT de

1742-02	71,2	2,2	-10,1	282,3	10,3	NA	NA
1742-03	71,5	10,4	-9,9	316,4	14,3	N82C-D	Morado-violeta
1742-04	60,3	3,9	-14,7	284,9	15,3	92A-B	Violeta-azul
1742-05	74,7	2,5	-10,3	283,9	10,6	91B	Violeta-azul
1742-07	79,4	4,5	-4,7	314,0	6,5	76B	Morado
1742-08	69,7	3,0	-10,7	285,5	11,1	92B	Violeta-azul
1742-10	79,4	3,6	-4,0	312,0	5,4	N82D	Morado-violeta
1742-13	54,0	2,8	-19,6	278,2	19,8	96B	Violeta-azul
1742-14	59,6	12,5	-14,4	310,9	19,0	N87B	Violeta
1742-18	75,9	2,0	-7,3	284,9	7,6	92B	Violeta-azul
1742-20	68,3	7,5	-9,4	308,4	12,1	N87C-D	Violeta
1742-22	70,8	3,9	-9,0	293,3	9,8	91B	Violeta-azul
1742-23	60,9	5,3	-21,2	284,0	21,9	96C-D	Violeta-azul
1742-24	61,8	5,2	-16,5	287,4	17,3	92B	Violeta-azul
1742-25	73,5	5,5	-9,1	301,2	10,6	N88C	Violeta
1742-26	66,4	11,5	-8,8	322,6	14,4	N80C	Morado-violeta
1742-28	74,9	8,4	-5,7	326,0	10,1	84B-C	Violeta
1742-30	74,5	8,1	-7,5	317,1	11,0	N82D	Morado-violeta
1742-31	66,7	6,9	-15,6	293,8	17,1	92A-B	Violeta-azul
1742-33	76,8	5,0	-4,4	318,6	6,6	76B	Morado
1742-34	75,7	2,8	-6,6	293,1	7,1	85B	Violeta
1742-36	65,5	5,2	-9,4	299,0	10,8	85B-C	Violeta
1742-37	72,5	5,8	-8,9	303,1	10,6	85B	Violeta
1742-38	72,7	6,0	-8,4	305,5	10,3	N82D	Morado-violeta
1742-39	66,7	3,1	-15,0	281,9	15,3	96C-D	Violeta-azul
1742-44	74,4	5,8	-6,7	310,7	8,8	N87C	Violeta
1761-07	74,9	9,1	-9,7	313,1	13,3	85A	Violeta
1761-08	74,0	7,3	-6,3	318,9	9,6	76A	Morado

*Valor medio (n=23)

NA: No se puede analizar o medir

[0066]

[Ejemplo 16: Introducción de pB427 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen DFR de clitoria y el gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de pMCE5-2 ADHNF-CtDFR obtenido en el ejemplo 7 con FseI y PmeI, con un fragmento de ADN de vector binario pB315 obtenido mediante digestión con FseI y SmaI, con el fin de obtener pBCam2+CtDFR. Se unió un fragmento de ADN obtenido mediante digestión de este vector binario con FseI y SmaI, con un casete CmF3Hp1k:ADHNF- CtA3’5’GT:AtHSPt obtenido mediante digestión de pMCE5-2 ADHNF-CtA3’5’GT con FseI y PmeI, con el fin de obtener pB427 (pBCam2+CtDFR+CtA3’5’GT).

[0067]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB427 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 24 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se encontró en 15 líneas (63%) una alteración del color de la flor hacia el azul. En 4 líneas (17% del total) se exhibió azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$ y se exhibió el color de la flor en el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS. En las líneas con el rasgo de flor azul, se confirmó acumulación de las antocianinas principales 3', 5'-diglucósido de 3-(6"-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y 3,3',5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5). A continuación en la Tabla 16, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 16]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1743-10	74,2	6,2	-6,5	313,6	9,0	N78C	Morado
1743-31	76,7	2,4	-5,0	295,5	5,5	85B	Violeta
1743-32	72,8	3,2	-5,8	299,1	6,6	NA	NA
1743-36	71,0	4,5	-7,8	300,3	9,0	85A	Violeta
1743-38	75,8	2,4	-6,2	291,5	6,7	85B	Violeta
1743-40	70,9	9,5	-12,7	307,0	15,9	85A	Violeta
1743-41	67,4	8,2	-13,3	301,6	15,6	85A	Violeta
1743-43	60,9	4,0	-18,4	282,4	18,8	94B	Violeta-azul
1743-44	77,5	2,9	-3,5	309,7	4,6	N82D	Violeta
1743-46	75,2	7,2	-6,7	317,2	9,8	76A-B	Morado
1743-47	73,6	8,8	-9,1	313,9	12,7	85A	Violeta
1743-48	68,5	6,6	-11,4	300,3	13,2	85A	Violeta
1743-49-1	64,9	4,2	-17,0	283,8	17,5	94B	Violeta-azul
1743-49-2	62,8	3,5	-15,7	282,5	16,1	96D	Violeta-azul
1743-50	75,4	-0,6	-5,2	264,0	5,3	97B-C	Violeta-azul

*Valor medio (n=23)

NA: No se puede analizar o medir

[0068]

[Ejemplo 17: Introducción de pB419 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen AGS de clitoria y el gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se unió un fragmento de ADN obtenido mediante digestión de pBSII-ADH-CtA3’5’GT con NheI y EcoICRI, con un fragmento de vector que se obtuvo mediante digestión de pMCE5-2 (FASS-CmF3Hp-AtHSpt) con NheI y EcoICRI, con el fin de obtener pMCE5-2 ADHNF- CtA3’5’GT. Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de este plásmido con FseI y PmeI, con un fragmento de vector binario de pB420 (pBCam2+CtAGS; ejemplo de referencia 4) obtenido mediante digestión con FseI y SwaI, con el fin de obtener pB419 (pBCam2+CtAGS+CtA3’5’GT).

[0069]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB419 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 20 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se encontró en 12 líneas (60%) una alteración del color de la flor hacia el azul. En 5 de las líneas (25% del total), se exhibió color azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$. En 3 líneas (15% del total), se exhibió el color de la flor en el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS. En las líneas con el rasgo de flor azul, se confirmó acumulación de las antocianinas principales 3’, 5’-diglucósido de 3-(6’’-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y 3,3’,5’-triglucósido de delfinidina (preternatina C5). A continuación en la Tabla 17, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 17]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1732-01	64,7	3,3	-15,3	282,3	15,6	96C-D	Violeta-azul
1732-04	75,2	4,2	-6,8	301,9	8,0	85A	Violeta
1732-06	75,5	3,3	-6,4	297,2	7,2	85B	Violeta
1732-08	72,4	2,4	-9,0	285,1	9,3	85B	Violeta
1732-11	74,7	9,3	-6,3	325,6	11,2	N80C-D	Morado-violeta
1732-12	61,9	3,9	-18,5	281,9	18,9	96C-D	Violeta-azul
1732-13	72,7	6,0	-6,5	312,9	8,9	85A-B	Violeta
1732-14	72,6	6,9	-8,5	309,0	11,0	85A	Violeta
1732-15	73,4	2,8	-8,9	287,4	9,3	91B	Violeta-azul
1732-16	73,1	5,9	-7,8	307,3	9,8	85A-B	Violeta
1732-17	73,6	3,3	-9,9	288,3	10,4	NA	NA
1732-21	80,6	9,0	-4,1	335,6	9,9	N80D	Morado-violeta

*Valor medio (n=23)

NA: No se puede analizar o medir

[0070]

[Ejemplo 18: Introducción de pB432 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen AGS de clitoria, el gen A3’5’GT de clitoria y el gen del iris holandés DFR bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de pMCE5-2-ADHNF-DbDFR con FseI y PmeI, con un fragmento de vector binario de pB419 (pBCam2+CtAGS+CtA3’5’GT) obtenido mediante digestión con FseI y SwaI, con el fin de obtener pB432 (pBCam2+CtAGS+CtA3’5’GT+IhDFR).

[0071]**[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor**

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB432 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 47 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro

espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se encontró en 23 líneas (49%) una alteración del color de la flor hacia el azul. En 12 de las líneas (26% del total), se exhibió color azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$. En 13 líneas (28% del total), se exhibió el color de la flor en el grupo azul o el grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS. En las líneas con el rasgo de flor azul, se confirmó acumulación de las antocianinas principales 3', 5'-diglucósido de 3-(6''-malonil)glucósido de delfinidina (ternatina C5) y 3,3',5'-triglucósido de delfinidina (preternatina C5). A continuación en la Tabla 18, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 18]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1740-02	64,8	3,6	-16,5	282,2	16,9	96C-D	Violeta-azul
1740-03	69,0	13,2	-11,7	318,5	17,7	N81B-C	Morado-violeta
1740-05	68,0	2,3	-12,0	280,9	12,3	91B-C	Violeta-azul
1740-08	74,2	7,7	-2,2	344,1	8,0	N80C	Morado-violeta
1740-09	66,8	4,8	-14,4	288,4	15,2	94B	Violeta-azul
1740-10	72,4	5,3	-10,9	295,8	12,1	92B	Violeta-azul
1740-18	58,9	5,3	-21,0	284,1	21,7	96D	Violeta-azul
1740-19	49,9	23,7	-22,1	316,9	32,4	N82A-B	Morado-violeta
1740-20	67,4	11,3	-10,7	316,4	15,6	N82B	Morado-violeta
1740-21	71,0	7,0	-9,5	306,4	11,8	N88C	Violeta
1740-22	70,3	6,3	-12,4	296,8	13,9	N88C-D	Violeta
1740-23	72,5	3,2	-10,2	287,2	10,7	91A-B	Violeta-azul
1740-24	61,9	13,0	-8,1	328,0	15,4	N80C	Morado-violeta
1740-25	75,2	3,9	-7,6	296,9	8,6	85b	Violeta
1740-26	67,9	6,0	-6,4	312,9	8,8	N88C	Violeta
1740-29	61,5	4,1	-14,7	285,7	15,3	94B-C	Violeta-azul
1740-35	64,6	4,2	-16,1	284,6	16,6	94B-C	Violeta-azul
1740-37	64,8	2,2	-16,6	277,4	16,7	96D	Violeta-azul
1740-38	72,0	2,8	-11,4	284,0	11,7	94C-D	Violeta-azul
1740-40	74,3	0,6	-9,5	273,5	9,5	96D	Violeta-azul
1740-43	50,5	4,2	-24,7	279,7	25,0	99B-C	Azul
1740-54	43,1	28,0	-23,6	319,8	36,6	83B	Violeta
1740-57	63,5	3,7	-18,9	281,1	19,3	96B-C	Violeta-azul

*Valor medio (n=23)

[0072]

[Ejemplo 19: Introducción de pB423 en variedad de crisantemo “*Sei Shawl*” (coexpresión del gen A3'5'GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo

1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3'5'H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se creó pB423 plásmido (pBCtA3'5'GT+CamF3'5'H) de acuerdo con el ejemplo 1.

[0073]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó la variedad de crisantemo decorativo grande de color rosa “*Sei Shawl*” (Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB423 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 2 líneas transformantes. Los resultados de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS indicaron que en 1 línea (50%) se creó el crisantemo azul que tenía un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$ y que exhibía color en el grupo violeta-azul según la tabla de colores RHS. A continuación en la Tabla 19, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 19]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Sei Shawl Tipo silvestre*	80,5	11,4	-1,1	354,5	11,5	N74C	Rojo-morado
Transformantes de Sei Shawl							
2022-01	83,0	0,5	-22	282,2	2,3	NA	NA

*Valor medio (n=23)

NA: No se puede analizar o medir

[0074]

[Ejemplo 20: Introducción de pB423 en variedad de crisantemo “*Candela Tierra*” (coexpresión del gen A3'5'GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3'5'H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se creó pB423 plásmido (pBCtA3'5'GT+CamF3'5'H) de acuerdo con el ejemplo 1.

[0075]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó la variedad de crisantemo decorativo de color rosa “*Candela Tierra*” (Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB423 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 3 líneas transformantes. Los resultados de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS indicaron que en 1 línea (33%) se creó el crisantemo azul que exhibía color en el grupo violeta-azul según la tabla de colores RHS.

A continuación en la Tabla 20, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 20]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Candela Tierra Tipo silvestre*	54,7	30,9	-12,0	338,8	33,1	71B	Rojo-morado
Transformantes de Candela Tierra							
1946-03	56,8	8,3	-21,8	290,8	23,3	96B	Violeta-azul
1985-04	53,3	7,5	-17,4	293,2	19,0	NA	NA
2052-07	54,2	14,4	-19,0	307,1	23,8	NA	NA

NA: No se puede analizar o medir

[0076]

[Ejemplo 21: Introducción de pB423 en línea de crisantemo “T10” (coexpresión del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se creó pB423 plásmido (pBCtA3’5’GT+CamF3’5’H) de acuerdo con el ejemplo 1.

[0077]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó la línea de crisantemo decorativo de color carmesí “T10” (línea de reproducción muestreada suministrada por Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB423 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 3 líneas transformantes. Los resultados de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS indicaron que en 1 línea (33%) se creó el crisantemo azul que exhibía color en el

grupo violeta-azul según la tabla de colores RHS. A continuación en la Tabla 21, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 21]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
T10 Tipo silvestre*	31,1	43,1	-10,3	346,5	44,3	71A	Rojo-morado
Transformantes de T10							
1945-01	32,0	16,1	-31,2	297,3	35,1	N89B	Violeta-azul
2051-01	21,9	25,5	-16,0	327,9	30,1	NA	NA

NA: No se puede analizar o medir

[0078]

[Ejemplo 22: Introducción de pB423 en línea de crisantemo “T24” (coexpresión del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se creó pB423 plásmido (pBCtA3’5’GT+CamF3’5’H) de acuerdo con el ejemplo 1.

[0079]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó la línea de crisantemo *atsumono* grande de color rosa “T24” (línea de reproducción muestreada suministrada por Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB423 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 4 líneas transformantes. Los resultados de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS indicaron que en 1 línea (25%) se creó el crisantemo azul que tenía un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$ y que exhibía color en el grupo violeta-azul según la tabla de colores RHS. A continuación en la Tabla 22, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 22]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
T24 Tipo silvestre*	44,6	39,3	-14,6	339,6	41,9	N74B-C	Rojo-morado
Transformantes de T24							
1999-01	65,1	1,5	-17,5	274,9	17,6	100D	Azul
2044-01	60,0	6,4	-13,0	296,0	14,5	NA	NA
1999-02	68,1	9,6	-6,5	325,9	11,6	82D	Morado-violeta
2019-01	76,8	10,7	-1,3	353,1	10,8	NA	NA

NA: No se puede analizar o medir

[0080]

[Ejemplo 23: Introducción de pB423 en línea de crisantemo “T27” (coexpresión del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se creó pB423 plásmido (pBCtA3’5’GT+CamF3’5’H) de acuerdo con el ejemplo 1.

[0081]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó una línea de crisantemo de pompón de color rosa “T27” (línea de reproducción muestreada suministrada por Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB423 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 21 líneas transformantes. Los resultados de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS indicaron que se creó el crisantemo azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$ en 11 líneas (52%) y que exhibía color en el grupo violeta-azul según la tabla de colores RHS en 17 líneas (81%). A continuación en la Tabla 23, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 23]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
T 27 Tipo silvestre*	75,1	16,9	-4,6	344,8	17,5	73B	Rojo-morado

Transformantes de T27							
1964-01	60,3	3,8	-16,4	283,2	16,8	96C	Violeta-azul
1964-04	72,9	6,3	-4,8	323,0	7,9	84A-B	Violeta
1964-05	62,9	4,3	-16,2	284,9	16,7	96C-D	Violeta-azul
1964-06	62,0	6,2	-16,3	290,6	17,5	94B	Violeta-azul
1964-07	62,0	6,7	-15,7	293,2	17,1	92A	Violeta-azul
1964-08	65,5	4,9	-12,0	292,2	12,9	96C-D	Violeta-azul
1964-09	57,4	3,7	-14,8	284,1	15,3	96C-D	Violeta-azul
1964-10	66,5	2,9	-4,6	301,8	5,5	96C-D	Violeta-azul
1964-11	55,2	4,4	-17,3	284,4	17,8	96D	Violeta-azul
1964-12	61,9	7,5	-11,1	304,0	13,4	91A	Violeta-azul
1964-13	62,1	4,5	-11,7	290,8	12,5	85B-C	Violeta
1974-01	55,9	2,0	-11,4	279,9	11,6	97A	Violeta-azul
1974-02	61,9	4,0	-16,2	283,8	16,7	97A	Violeta-azul
1974-03	62,2	4,2	-13,1	287,8	13,8	93C-D	Violeta-azul
1974-04	71,4	2,4	-5,6	293,7	6,1	94B-C	Violeta-azul
1974-06	63,0	0,8	-8,5	275,0	8,6	94B	Violeta-azul
1974-07	59,2	3,5	-15,7	282,5	16,1	94C	Violeta-azul
1974-08	68,8	4,1	-6,9	300,9	8,0	85B-C	Violeta
1974-09	72,3	12,4	-9,2	323,3	15,4	N81C-D	Morado-violeta
1974-12	59,9	2,0	-8,4	283,4	8,6	91B	Violeta-azul
2006-03	69,1	2,5	-10,6	283,3	10,9	96D	Violeta-azul

[0082]

[Ejemplo 24: Introducción de pB423 en línea de crisantemo “T44” (coexpresión del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se creó pB423 plásmido (pBCtA3’5’GT+CamF3’5’H) de acuerdo con el ejemplo 1.

[0083]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó una línea de crisantemo de pompón de color rosa “T44” (línea de reproducción muestreada suministrada por Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB423 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 12 líneas transformantes. Los resultados de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS indicaron que se creó el crisantemo azul con un ángulo de tonalidad de $\leq 290^\circ$ en 4 líneas (33%) y que exhibía color en el grupo violeta-azul según la tabla de colores RHS en 3 líneas (25%). A continuación en la Tabla 24, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 24]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
T 44 Tipo silvestre*	74,2	12,5	-2,7	347,8	12,8	74D-75A	Rojo-morado
Transformantes de T 44							
2032-02	70,1	2,8	-3,5	309,1	4,5	85B-C	Violeta
2032-04	65,1	4,8	-10,5	294,9	11,5	93C-D	Violeta-azul
2032-05	72,7	2,5	-6,1	292,4	6,6	92B-C	Violeta-azul
2032-06	71,3	5,1	-3,4	326,7	6,1	85B-C	Violeta
2050-01	73,2	1,9	-4,9	290,6	5,3	NA	NA
2050-04	78,1	0,5	-4,0	276,7	4,1	95C-D	Violeta-azul
2067-05	49,2	5,6	-11,4	296,1	12,7	NA	NA
2067-01	68,2	1,6	-7,1	282,3	7,3	NA	NA
2067-02	60,0	3,9	-11,9	288,3	12,5	NA	NA
2050-06	43,6	6,3	-12,5	296,6	14,0	NA	NA
2067-06	57,2	6,1	-7,7	308,5	9,8	NA	NA
2067-07	69,1	3,5	-11,6	286,9	12,1	NA	NA

NA: No se puede analizar o medir

[0084]

[Ejemplo 25: Introducción de pB423 en línea de crisantemo “T57” (coexpresión del gen A3’5’GT de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*, y el gen F3’5’H de campánula bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Arabidopsis* HSP)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se creó pB423 plásmido (pBCtA3’5’GT+CamF3’5’H) de acuerdo con el ejemplo 1.

[0085]**[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor**

Se transformó la línea de crisantemo decorativo de color rosa “T57” (línea de reproducción muestreada suministrada por Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB423 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 2 líneas transformantes. Los resultados de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS indicaron que en 2 líneas (100%) se creó el crisantemo azul que exhibía un ángulo de $\leq 290^\circ$ y color en el grupo violeta-azul según la tabla de colores RHS. A continuación en la Tabla 25, se muestran los valores medidos para los transformantes que confirmaron tener una modificación del color de la flor hacia el azul se muestran.

[Tabla 25]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Tipo silvestre*	74,4	16,9	-5,5	341,9	17,8	N74C	Rojo-morado
Transformantes de							
2037-01	58,8	6,0	-20,2	286,4	21,1	84B	Violeta-azul
2037-02	60,4	5,8	-19,2	286,9	20,0	94A	Violeta-azul

[0086]

[Ejemplo de referencia 1: Introducción de pB248 en línea de crisantemo “94-765” (expresión del gen A3’5’GT derivado de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 500 y el terminador *Agrobacterium nos*)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se combinaron y utilizaron como patrones un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pBSCtBGT1DB24 plásmido, descrito en la patente japonesa No. 4418865 y que contiene el gen A3’5’GT de clitoria, como patrón, y ADH-3’5’GT-Fd (5’-CAAGAAAAATAAATGGAAAACAATAAGCATGTC-3’; el subrayado indica la secuencia que se alinea con la región codificante de Ct3’5’GT; SEC ID NO: 26) y Hind-Ct3’5’GT-Rv(5’- AAGCTTGCGTTTTTAGCATCATTC-3’; SEC ID NO: 27) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pBI221 ADH-221 como patrón, y el XbaI-ADH-Fd (5’-ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3’; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5’UTR 94 pb; SEC ID NO: 14) y el Ct3’5’GT-ADH-Rv (5’-ATTGTTTTCCATTTTTCTTGATTTCCTTCAC-3’; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5’UTR 94 pb; SEC ID NO: 28) como cebadores, para PCR con el uso de XbaI-ADH-Fd e Hind-Ct3’5’GT-Rv como cebadores, con el fin de obtener un fragmento de ADN que tiene ADH-5’UTR 94 pb de tabaco unido directamente al codón de inicio del gen A3’5’GT de clitoria. Se unió un fragmento de ADN de aproximadamente 600 pb obtenido mediante clonación de TA de este fragmento de ADN en pCR2.1 seguido de digestión con XbaI y HindIII, con un fragmento de ADN de vector obtenido mediante digestión de pBlueScript II SK(+) con XbaI y HindIII, con el fin de obtener pBSII-ADH-5’-CtBGT1-HindIII. Se unió un fragmento de ADN plasmídico obtenido mediante digestión de este plásmido con HindIII y XhoI, con un fragmento de

ADN obtenido mediante digestión de pBSCtBGT1DB24 con HindIII y XhoI, con el fin de obtener pBSII-ADH-CtA3'5'GT. Se clonó un producto de ADN de extremos despuntados, que se había amplificado mediante PCR con el uso del plásmido antes mencionado como patrón, y el NheI-ADH-Fd2 (5'-GCTAGCGTCTATTTAACTCAGTATTCAGAAAC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 29) y el Ct3'5'GT-SacI-Rv (5'-GAGCTCTTAGCTAGAGGAAATCATTTCAC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con la región codificante de Ct3'5'GT; SEC ID NO: 30) como cebadores, en pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) para obtener pCR ADHNF-CtA3'5'GT. Se unió un fragmento de ADN ADHNF-CtA3'5'GT de aproximadamente 1450 pb obtenido mediante digestión de este plásmido con NheI y EcoICRI, con un fragmento de ADN de vector binario obtenido mediante digestión de pBI121 HANS-CmF3Hp500-X (patente japonesa No. 5697040) con XbaI y EcoICRI, con el fin de obtener pB248 (pBI121 CmF3Hp500:ADHNF-ClitoriaA3'5'GT:NOS_t).

[0087]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó la línea de crisantemo mediano de color rojo oscuro “94-765” (línea de reproducción muestreada suministrada por Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB248 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 23 líneas transformantes. De estos, se analizaron los pigmentos de antocianina en los pétalos ligulados de 15 líneas mediante cromatografía líquida de alta resolución en las siguientes condiciones. La elución isocrática se llevó a cabo con Inertsil ODS-2 (diámetro de partícula: 5 µm, 4,6 x 250 mm, GL Sciences Inc.) como la columna, con una velocidad de flujo de 0,8 ml/min y una fase móvil que contiene 1,5% de ácido fosfórico, durante 20 minutos con un gradiente de concentración lineal del 5% de ácido acético, 6,25% de acetonitrilo a 20% de ácido acético, 25% de acetonitrilo, seguido de 5 minutos con 25% de acetonitrilo que contiene 1,5% de ácido fosfórico y 20% de ácido acético. La detección se llevó a cabo con el uso de un detector de matriz de diodos Agilent 1100 Series (GL Sciences Inc.) en un rango de longitud de onda de 250 nm a 600 nm.

Como resultado del análisis, se confirmó que 12 líneas tenían dos pigmentos principales, 3'-glucósido de 3-(6-malonil)glucósido de cianidina y 3'-glucósido de 3-(3", 6"-dimalonil)glucósido de cianidina (tiempos de elución de HPLC (t_R): 9,4 minutos y 7,2

minutos, respectivamente), que se cree son las antocianinas principales de los pétalos del huésped, 3-(6"-malonil)glucósido de cianidina y 3-(3", 6"-dimononil)glucósido de cianidina, con un grupo glucosilo unido a cada una. Sin embargo, no se obtuvieron líneas con ningún cambio de importancia en el color de las flores con respecto al 94-765 original, y todas las líneas transformadas exhibieron colores de flores en el grupo rojo-morado según la tabla de colores RHS (Tabla 26). No se pudo obtener crisantemo azul al expresar solo el gen A3'5'GT de clitoria con el promotor F3H de crisantemo 500 (longitud: ~ 500b) (figura 6).

[Tabla 26]

No. de línea		HPLC*		Tabla de colores RHS		Sistema de color CIEL*a*b*				
No. de infección	No. individual	9,4 tR	7,2 tR	No. de tabla	Grupo de color	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)
94-765		-	-	64A-B	Rojo-morado	34,5	38,0	-7,0	350,1	38,7
Tipo silvestre**				71A-B						
Transformantes 94-765										
1355-	1	+	+	71A	Rojo-morado	32,6	38,1	-8,8	347,0	39,1
1355-	3	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	4	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	6	+	+	72B	Rojo-morado	45,2	33,9	-15,0	336,1	37,1
1355-	7	+	+	72B	Rojo-morado	44,1	37,3	-13,6	340,0	39,7
1355-	9	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	11	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	12	+	+	70A-B	Rojo-morado	50,7	31,7	-12,8	338,0	34,2
1355-	13	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	14	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	17	-	-	71A	Rojo-morado	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	18	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	19	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	20	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	23	+	+	72A-B	Rojo-morado	33,9	37,4	-15,8	337,1	40,5

*: +: detectado, traza: cantidad de traza o no detectado, 9,4 tR: 3'-glucósido de 3-(3,6-dimalonil)glucósido de cianidina, 7,2 tR: 3'-glucósido de 3-(3-malonil)glucósido de cianidina

** : Valor medio (n=14)

NA: No se puede analizar o medir

[0088]

[Ejemplo de referencia 2: Introducción de pB249 en línea de crisantemo "94-765" (expresión del gen A3'5'GT derivado de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador *Agrobacterium nos*)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se unió un fragmento de ADN de vector binario obtenido mediante digestión de pBI121 HANS-CmF3Hp1k-S (patente japonesa No. 5697040) con SpeI y EcoICRI, con un

fragmento de ADN de A3'5'GT de clitoria ADHNF obtenido mediante digestión de pCR ADHNF-CtA3'5'GT con NheI y EcoICRI, con el fin de obtener pB249 (pBI121 CmF3Hp1k:ADHNF-Clitoria A3'5'GT:NOST).

[0089]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se transformó la línea de crisantemo mediano de color rojo oscuro “94-765” (línea de reproducción muestreada suministrada por Inochio Seikoen) con el uso de *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB249 (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood), y se obtuvieron 25 líneas transformantes. Como resultado del análisis de los pigmentos de antocianina en los pétalos ligulados de 18 líneas mediante el método del ejemplo de referencia 1, se confirmó que 17 líneas tenían dos pigmentos principales que se pensaba eran 3-(6"-malonil)glucósido de cianidina y 3-(3", 6"-dimalonil)glucósido de cianidina con un grupo glucosilo unido a cada uno. Además, no se obtuvieron líneas con ningún cambio de importancia en el color de las flores con respecto al 94-765 original, y todas exhibieron colores de flores en el grupo rojo-morado (Tabla 27). No se pudo obtener crisantemo azul al expresar solo el gen A3'5'GT de clitoria con el promotor F3H de crisantemo 1k (longitud: ~ 1kb) (figura 6).

[Tabla 27]

No. de línea		HPLC*		Tabla de colores RHS		Sistema de color CIEL*a*b*				
No. de infección	No. individual	9,4 tR	7,2 tR	No. de tabla	Grupo de color	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)
94-765		-	-	64A-B	Rojo-morado	34,5	38,0	-7,0	350,1	38,7
Tipo silvestre**				71A-B						
Transformantes 94-765										
1356-	1	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	2	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	4	+	traza	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	6	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	8	traza	traza	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	9	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	10	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	12	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	15	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	17	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	18	+	traza	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	19	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	20	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	21	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	22	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	23	+	+	72B /74C	Rojo-morado	42,5	35,8	-15,7	336,3	39,1

1356-	24	+	+	70A-B	Rojo-morado	42,7	37,5	-14,8	338,5	40,3
1356-	25	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*: +: detectado, traza: cantidad de traza o no detectado, 9,4 tR: 3'-glucósido de 3-(3,6-dimalonil)glucósido de cianidina, 7,2 tR: 3'-glucósido de 3-(3-malonil)glucósido de cianidina

**.: Valor medio (n=14)

NA: No se puede analizar o medir

[0090]

[Ejemplo de referencia 3: Introducción de pB250 en línea de crisantemo “94-765” (coexpresión del gen A3'5'GT derivado de clitoria, el gen AGS derivado de clitoria y el gen A3'AT derivado de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador *Agrobacterium nos*)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se combinaron y utilizaron un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pBSII-CtGT11-4-14, descrito en la patente japonesa No. 4418865 y que contiene el gen CtAGS que codifica la 1-O-acilglucosa sintasa de clitoria (CtAGS, UDP-glucosa: 1-O-glucosiltransferasa de hidroxycinamato, figura 2) como patrón, y el ADH-CtHCAGT-Fd (5'-CAAGAAAAATAAATGGGGTCTGAAGCTTCGTTTC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con la región del código genético CtAGS; SEC ID NO: 31) y el StuI-CtHCAGT-Rv (5'-AGGCCTCATGTTCACAACTTC-3', SEC ID NO: 32) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pBI221 ADH-221 como patrón, y el XbaI-ADH-Fd (5'-ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 14) y el CtHCAGT-ADH-Rv (5'-TTCAGACCCCATTTATTTTCTTGATTTCCTTCAC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 33) como cebadores, para PCR con el uso de XbaI-ADH-Fd (SEC ID NO: 14) y Stu-CtHCAGT-Rv (SEC ID NO: 32) como cebadores, con el fin de obtener un fragmento de ADN que tiene ADH-5'UTR 94 pb de tabaco unido directamente al codón de inicio del gen CtAGS. Se unió un fragmento de ADN de aproximadamente 850 pb obtenido mediante clonación de TA de este fragmento de ADN en pCR2.1 (Invitrogen) seguido de digestión con XbaI y StuI, con un fragmento de vector obtenido mediante digestión de pBSII-CtGT11-4-14 con XbaI y StuI, con el fin de obtener pBSII-ADH-CtAGS. Se unió un fragmento de ADN obtenido al despuntar los extremos del producto de digestión XhoI de este plásmido y luego mediante digestión con

XbaI, con el fragmento de vector obtenido mediante digestión de pMCE5 con NheI y EcoICRI, con el fin de obtener pMCE5-ADH-AGS. Se unió un fragmento de ADN del casete de expresión de genes AscI-CmF3Hp1k:NtADH- 5'UTR:CtAGS:nost-PmeI obtenido mediante digestión de este plásmido con AscI y PmeI, con un fragmento de ADN de vector binario pMCE5-ADH-CtAGS obtenido mediante digestión de pB249 (pBI121 CmF3Hp1k:ADHNF-Clitoria A3'5'GT:NOST) con SmaI y AscI, con el fin de obtener pBI121-CtBGT+AGS.

[0091]

Se combinaron y utilizaron un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pBSII-CtAT1-19, que es uno de los clones de ADNc de CtSCPL1 descrito en la patente japonesa No. 4418865, que contiene el gen A3'AT de clitoria que se cree que tiene actividad 3'AT y actividad 5'AT (figura 2), como patrón, y el ADH-CtAT1-Fd (5'-CAAGAAAAATAAAATGGCAGCCTTCAGTTCAAC-3'; el subrayado indica la región que se alinea con CtAT1; SEC ID NO: 34) y el Pst-CtAT1-Rv (5'-CTGCAGCATCTGTTCTAGCATAA-3'; SEC ID NO: 35) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado mediante PCR con el uso de pBI221 ADH-221 como patrón, y el XbaI-ADH-Fd (5'-ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 14) y el CtAT1-ADH-Rv (5'-GAAGGCTGCCATTTATTTTCTTGATTTCCTTCAC- 3'; el subrayado indica la secuencia que se alinea con NtADH-5'UTR 94 pb; SEC ID NO: 36) como cebadores, para PCR con el uso de XbaI-ADH-Fd (SEC ID NO: 14) y Pst-CtAT1-Rv (SEC ID NO: 35) como cebadores, con el fin de amplificar un fragmento de ADN que tiene NtADH-5'UTR 94 pb unido directamente con el codón de inicio del gen CtAT. Este fragmento de ADN se digirió con XbaI y PstI y se unió con un fragmento de ADN obtenido mediante digestión de pBSII-CtAT1-19 con SpeI y PstI, con el fin de obtener pBSII-ADHNF-CtAT1-19. Se unió un fragmento de ADN de aproximadamente 1,6 kb obtenido mediante digestión de este plásmido con NotI y XhoI, con un fragmento plásmido obtenido mediante digestión con NotI y XhoI de pCR2.1, que se había circulado debido a la autoligación después de la digestión con EcoRI, con el fin de obtener pCR-ADHNF-CtAT1-19. Además, se unió un fragmento de ADN de aproximadamente 1,6 kb obtenido mediante digestión de pBSII-ADHNF-CtAT1-19 con EcoICRI y SalI, con un fragmento de

1357-	1	-	-	71A	Rojo-morado	32,6	38,1	-8,8	347,0	39,1
1357-	2	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	3	+	traza	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	4	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	5	+	traza	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	6	+	+	72B	Rojo-morado	33,1	39,2	-13,6	340,8	41,5
1357-	7	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	8	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	9	+	+	70A-B	Rojo-morado	40,7	38,2	-14,7	338,9	40,9
1357-	10	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	11	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*: +: detectado, traza: cantidad de traza o no detectado, 9,4 tR: 3'-glucósido de 3-(3,6-dimalonil)glucósido de cianidina, 7,2 tR: 3'-glucósido de 3-(3-malonil)glucósido de cianidina

**.: Valor medio (n=14)

NA: No se puede analizar o medir

[0094]

[Ejemplo de referencia 4: Introducción de pB250 en línea de crisantemo “94-765” (coexpresión del gen A3'5'GT derivado de clitoria, el gen AGS derivado de clitoria y el gen AT derivado de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador *Agrobacterium nos*)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se unió un fragmento de ADN obtenido mediante digestión de pBSII-ADH-CtAGS obtenido en el ejemplo de referencia 3 con XhoI y mediante despuntada de los extremos, y luego mediante digestión con XbaI, con un fragmento de vector obtenido mediante digestión de pMCE5-2 (FASS-CmF3Hp-AtHSPT) con NheI y EcoICRI, con el fin de obtener pMCE5-2 ADHNF-CtAGS. Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de este plásmido con FseI y PmeI, con un fragmento de vector binario de pB315 (pBCam2) obtenido mediante digestión con FseI y SwaI, con el fin de obtener pB420 (pBCam2+CtAGS).

[0095]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB420 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 40 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se

encontró en 17 líneas una alteración del color de la flor hacia el azul. Sin embargo, incluso en las líneas con el azul más intenso, el color de la flor que se exhibía tenía un ángulo de tonalidad de 317° y se encontraba en el grupo morado-violeta de la tabla de colores RHS, o aproximadamente el mismo nivel que con la expresión del gen F3'5'H solo (Tabla 29). En la construcción del gen de transferencia para la coexpresión del gen de acilglucosa sintasa derivado de clitoria (CtAGS) con el gen F3'5'H, no se obtuvo crisantemo azul que exhibiera un color de flor con un ángulo de tonalidad de 230° a 290° y/o en el grupo violeta-azul/grupo azul.

[Tabla 29]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1731-03	60,5	18,2	-17,0	317,0	24,9	N82C	Morado-violeta
1731-06	66,3	12,9	-12,0	317,1	17,7	N82B	Morado-violeta
1731-07	57,6	21,5	-18,4	319,6	28,3	N81B	Morado-violeta
1731-10	56,8	20,2	-18,3	317,7	27,2	N82B	Morado-violeta
1731-12	75,8	8,4	-4,2	333,6	9,4	N80D	Morado-violeta
1731-13	73,5	9,4	-8,3	318,6	12,6	N81C-D	Morado-violeta
1731-20	62,8	17,9	-13,1	323,8	22,1	N81B-C	Morado-violeta
1731-21	58,8	17,8	-14,9	320,0	23,2	N81A-B	Morado-violeta
1731-24	68,9	20,0	-6,2	342,8	20,9	N81B-C	Morado-violeta
1731-26	68,3	11,9	-11,2	316,9	16,4	N80C	Morado-violeta
1731-27	75,3	9,5	-3,8	338,2	10,3	N81C-D	Morado-violeta
1731-28	72,4	12,1	-10,2	319,9	15,8	N80C	Morado-violeta
1731-30	54,8	23,1	-21,0	317,8	31,2	N82B	Morado-violeta
1731-33	55,8	21,7	-19,4	318,2	29,1	N81B	Morado-violeta
1731-35	60,0	19,2	-15,8	320,5	24,9	N81B-C	Morado-violeta
1731-38	66,0	18,3	-14,2	322,3	23,2	N81B-C	Morado-violeta
1731-40	60,4	15,5	-13,8	318,3	20,7	NA	NA

NA: No se puede analizar o medir

*Valor medio (n=23)

[0096]

[Ejemplo de referencia 5: Introducción de pB430 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (coexpresión del gen F3'5'H derivado de campánula, el gen AGS derivado de clitoria y el gen DFR derivado del iris holandés bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador de *Agrobacterium nos*)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se unió un casete de expresión obtenido mediante digestión de pMCE5- 2-ADHNF-DbDFR con FseI y PmeI, con un fragmento de vector binario de pB420 (pBCam2+CtAGS)

obtenido mediante digestión con FseI y SwaI, con el fin de obtener pB430 (pBCam2+CtAGS+IhDFR).

[0097]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB430 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*” (recurso genético muestreado mantenido por cultivo aséptico en el instituto NARO de ciencia de la floricultura), y se obtuvieron 54 líneas transformantes. Como resultado de la medición del color con un colorímetro espectroscópico (CD100, Yokogawa Electric Corp.) y una tabla de colores RHS, se encontró en 33 líneas (63%) una alteración del color de la flor hacia el azul. Sin embargo, el ángulo de tonalidad de la línea con el color azul más intenso fue de 315°, mientras que solo se obtuvieron líneas con colores en el grupo violeta o el grupo morado-violeta en la medición mediante RHSCC, y no hubo una alteración significativa en el color de la flor en comparación con la expresión del gen F3’5’H solo (Tabla 30). En la construcción del gen de transferencia para la coexpresión del gen de acilglucosa sintasa derivado de clitoria (CtAGS) y el gen DFR derivado del iris holandés con el gen F3’5’H, no se obtuvo crisantemo azul que exhibiera un color de flor con un ángulo de tonalidad de 230° a 290° y/o en el grupo violeta-azul/grupo azul.

[Tabla 30]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	79,5	9,7	-2,0	356,6	11,1	65B, N74C, 75B	Rojo-morado /Morado
Transformantes de Ohira							
1739-01	NA	NA	NA	NA	NA	N82C	Morado-violeta
1739-06	53,4	18,3	-17,1	316,8	25,0	N87B	Violeta
1739-07	53,2	17,2	-16,5	316,2	23,9	N87B	Violeta
1739-08	50,8	23,1	-20,5	318,3	30,9	N82A	Morado-violeta
1739-10	63,4	17,7	-13,1	323,5	22,0	N82B-C	Morado-violeta
1739-11	50,1	22,8	-22,4	315,5	31,9	NA	NA
1739-12	59,5	19,5	-17,6	318,0	26,3	N82A-B	Morado-violeta
1739-15	NA	NA	NA	NA	NA	N87A-B	Violeta
1739-17	47,2	20,8	-18,5	318,3	27,8	N87A	Violeta
1739-18	60,0	21,1	-16,3	322,4	26,6	83C-D	Violeta
1739-21	63,3	12,6	-5,3	337,1	13,7	83C-D	Violeta
1739-22	55,3	18,9	-18,5	315,6	26,5	N85A-B	Morado-violeta
1739-25	79,0	6,6	-4,5	326,0	8,0	N81C	Morado-violeta

1739-26	54,5	18,5	-16,4	318,5	24,8	N83C-D	Violeta
1739-28	36,3	30,1	-26,0	319,2	39,7	N87A-B	Violeta
1739-30	63,9	17,4	-10,8	328,2	20,4	N81C-D	Morado-violeta
1739-32	56,1	25,6	-16,9	326,5	30,7	N81B	Morado-violeta
1739-33	56,3	18,0	-16,2	318,1	24,2	N82B	Morado-violeta
1739-42	69,3	13,0	-11,5	318,4	17,3	N82B	Morado-violeta
1739-44	55,7	23,1	-20,2	318,9	30,7	N82A	Morado-violeta
1739-46	61,2	18,8	-15,1	321,4	24,1	N81B-C	Morado-violeta
1739-47	47,2	22,5	-20,3	317,9	30,3	N87B	Violeta
1739-48	71,4	13,5	-11,3	320,2	17,6	N80C	Morado-violeta
1739-50	49,3	21,0	-20,6	315,4	29,4	83B-C	Violeta
1739-54	50,2	21,3	-21,1	315,3	29,9	N87A	Violeta
1739-56	66,9	15,7	-10,2	327,1	18,7	N81B-C	Morado-violeta
1739-60	70,6	12,6	-11,3	318,0	16,9	84A-B	Violeta
1739-65	70,3	16,0	-8,1	333,1	18,0	N81B-C	Morado-violeta
1739-67	67,7	14,7	-11,7	321,4	18,8	N81B	Morado-violeta
1739-68	66,8	14,3	-9,7	326,0	17,3	N80B-C	Morado-violeta
1739-69	71,6	14,7	-9,8	326,3	17,7	N81C	Morado-violeta
1739-72	60,0	20,8	-17,7	319,7	27,3	82C-D	Violeta
1739-80	60,7	20,3	-15,4	322,8	25,5	N81B	Morado-violeta

NA: No se puede analizar o medir

*Valor medio (n=23)

[0098]

[Ejemplo de referencia 6: Introducción de pB249 en variedad de crisantemo “*Taihei*” (expresión del gen A3’5’GT derivado de clitoria bajo el control del promotor F3H de crisantemo 1k y el terminador *Agrobacterium nos*)]

[1] Ensamblaje de vectores

Se obtuvo pB249 plásmido (pBI121 CmF3Hp1k:ADHNF-Clitoria A3’5’GT:NOST) de acuerdo con el método del ejemplo de referencia 2.

[0099]

[2] Obtención de transformantes y medición del color de la flor

Se utilizó *Agrobacterium* EHA105 transferido con pB249 plásmido (suministrado por la Dra. Elizabeth E. Hood) para la transformación de la variedad de crisantemo mediano de color rosa “*Taihei*”, y se obtuvieron 26 líneas transformantes. No se obtuvieron líneas con ningún cambio de importancia en el color de las flores con respecto al “*Taihei*” original, e incluso las líneas que mostraron alguna alteración del color de la flor exhibieron un color de flor del grupo morado 75 (Tabla 31). Como en el caso del “94-765” del ejemplo de referencia 2, no se pudo obtener crisantemo azul simplemente al expresar el gen A3’5’GT de clitoria con el promotor F3H de crisantemo 1k (longitud: ~1 kb).

[Tabla 31]

No. de línea	Sistema de color CIEL*a*b*					Tabla de colores RHS	
	L	A	B	Ángulo de tonalidad (hue°)	Croma (C)	No. de tabla	Grupo de color
Ohira Tipo silvestre*	73,1	16,4	-5,1	342,9	17,2	74c	Rojo-morado
Transformantes de Ohira							
1979-01	84,4	5,6	1,0	370,3	5,7	NA	NA
1979-02	79,4	8,0	-0,6	355,7	8,0	NA	NA
1979-03	82,9	5,2	1,6	377,4	5,4	NA	NA
1979-04	79,0	7,6	0,2	361,6	7,6	NA	NA
1979-05	82,0	7,1	-1,2	350,5	7,2	NA	NA
1979-06	79,6	9,4	-1,8	349,2	9,5	NA	NA
1979-07	79,5	7,7	-0,8	353,9	7,7	NA	NA
1979-08	79,5	6,9	-0,1	358,8	6,9	NA	NA
1979-09	82,8	6,4	-0,2	358,6	6,4	NA	NA
1979-11	77,2	10,7	-0,7	356,3	10,7	NA	NA
1979-12	85,8	2,2	2,9	412,0	3,6	NA	NA
1979-13	78,9	6,7	0,3	362,8	6,7	75A-C	Morado
1979-15	78,1	7,9	-0,6	355,4	7,9	NA	NA
1979-16	78,3	7,1	-0,2	358,4	7,1	75A-B	Morado
1979-18	83,5	3,8	1,1	376,4	4,0	75C	Morado
1979-19	78,6	10,7	-1,6	351,8	10,8	NA	NA
1979-20	74,3	11,8	-3,0	345,7	12,2	77D/75A	Morado
1979-21	81,2	6,7	0,3	362,2	6,8	NA	NA
1979-22	75,3	10,2	-2,0	348,9	10,4	NA	NA
1979-23	81,0	7,9	-1,4	350,2	8,0	NA	NA
1979-24	77,9	7,6	-1,2	351,2	7,7	NA	NA
1979-25	84,0	5,1	0,8	368,9	5,1	NA	NA
1979-26	79,8	4,3	1,1	374,2	4,4	75B-C	Morado
1979-27	86,4	3,6	1,8	386,8	4,1	75C	Morado
1979-28	79,7	6,0	1,8	376,4	6,2	75C-D	Morado
1979-29	82,4	4,9	2,2	384,6	5,3	NA	NA

NA: No se puede analizar o medir

[Listado de secuencias]