

Descripción

Título de la invención: PLANTA TRANSGÉNICA CON COLORACIÓN FLORAL MODIFICADA Y NUEVO COMPUESTO CONTENIDO EN LA MISMA

Campo técnico

[0001]

La presente invención se refiere a una planta transgénica con coloración floral modificada; a un método para crearla; a un nuevo compuesto contenido en la planta transgénica; y a un método para producirla.

Estado de la técnica

[0002]

La rosa, el crisantemo y el clavel son flores ornamentales de gran importancia industrial en todo el mundo. En particular, la rosa, al ser la planta ornamental más popular con un historial de cultivo que se remonta a antes de Cristo, ha sido objeto de cruces artificiales durante cientos de años. Sin embargo, cuestiones como la ausencia de variedades silvestres con flores de color azul entre las especies emparentadas susceptibles de hibridación han dificultado la creación de variedades de rosa con flores de color azul mediante los métodos conocidos de cruces y mutación selectiva. La creación de un color de flor azul completamente nuevo contribuye a despertar una nueva demanda para usos aún más amplios de las flores ornamentales y contribuye al aumento de la producción y el consumo. Por lo tanto, se han realizado intentos para producir rosas con flores de color azul mediante técnicas de ingeniería genética.

[0003]

Dado que las flores de las plantas en la naturaleza expresan un color azul vivo a través de diversos mecanismos, tales como el efecto copigmentario (asociación intermolecular), la poliacilación (asociación intramolecular), la formación de un complejo metálico y el aumento del pH vacuolar, se ha desarrollado una variedad de rosa con color azul en las flores aplicando dicho mecanismo de coloración azul a la rosa; sin embargo, se ha considerado que la aplicación del mecanismo de desarrollo del color en organismos distintos de las plantas para alterar el color de las flores resulta extremadamente difícil.

[0004]

Se sabe que las bacterias gramnegativas, como *Chromobacterium violaceum*, biosintetizan violaceína y desoxi-violaceína como pigmentos azules naturales.

[0005]

El documento de patente 1 divulga que la violaceína puede utilizarse como colorante azul natural.

El documento de patente 2 describe un método de tratamiento para mejorar la resistencia a la luz de una fibra y un producto textil teñidos con violaceína o desoxi-violaceína.

El documento de patente 3 describe un método para producir desoxi-violaceína mediante la eliminación de VioD en un grupo de genes relacionados con la síntesis de violaceína que incluye VioA, VioB, VioC, VioD y VioE.

El documento de patente 4 describe un método para producir de manera eficiente violaceína o desoxi-violaceína mediante el uso de un microorganismo en el que se ha potenciado la actividad de una proteína que posee actividad VioA, actividad VioB, actividad VioC, actividad VioD y actividad VioE.

Sin embargo, apenas se conoce ningún intento de alterar el color de las flores mediante la acumulación de violaceínas producidas originalmente por microorganismos en los pétalos de las plantas.

Lista de citas

Documento de patente

[0006]

Documento de patente 1: JP H06-253864 A

Documento de patente 2: JP H11-152687 A

Documento de patente 3: JP 2011-527183 T

Documento de patente 4: JP 2021-19518 A

Documento no patentario

[0007]

Documento no patentario 1: «Expresión génica transitoria en pétalos de rosa mediante infiltración de *Agrobacterium*», Plant Cell Tiss Organ Cult (2010) 102: 245-250

Resumen de la invención

Problema técnico

[0008]

El problema que pretende resolver la presente invención es proporcionar una planta transgénica o su progenie endogámica o exogámica, o un propágulo, parte del cuerpo de la planta, tejido o célula de esta, con una alteración del color de la flor, preferiblemente una

alteración hacia un color azul, y proporcionar un compuesto novedoso contenido en la planta transgénica.

Solución al problema

[0009]

Como resultado de intensos estudios, sorprendentemente, los inventores han logrado acumular, en forma de pigmentos azules, desoxiviolaceína y un compuesto desconocido en las células de una planta mediante la modificación de cuatro genes, VioA, VioB, VioC y VioE, que son necesarios para la síntesis de desoxiviolaceína utilizando L-triptófano como sustrato de partida, para introducir los genes modificados en las células. Además, los inventores han aislado y purificado un pigmento azul del compuesto desconocido acumulado en las células de la planta, además de la desoxiviolaceína, y han logrado identificar el compuesto como desoxiviolaceína 15N- β -D-glucopiranosida, completando así la presente invención.

[0010]

La presente invención se refiere a lo siguiente.

[1]

Un gen VioA seleccionado del grupo que consiste en:

(1-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

(1-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir el L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA);

(1-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

(1-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, teniendo la proteína la función de convertir L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA); y

(1-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con un 90 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, teniendo la proteína la función de convertir L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA).

[2]

Un gen VioB seleccionado del grupo que consiste en:

(2-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3;

(2-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA;

(2-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;

(2-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, teniendo la proteína la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA; y

(2-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, teniendo la proteína la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA.

[3]

Un gen VioC seleccionado del grupo que consiste en:

(3-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5;

(3-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir el ácido prodeoxiviolaceínico en ácido deoxiviolaceínico;

(3-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(3-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, teniendo la proteína la función de convertir el ácido pro-desoxi-violaceínico en ácido desoxi-violaceínico; y

(3-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con un 90 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, teniendo la proteína la función de convertir el ácido pro-desoxi-violaceínico en ácido desoxi-violaceínico.

[4]

Un gen VioE seleccionado del grupo que consiste en:

(4-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7;

(4-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir un dímero de imina IPA en ácido prodeoxiviolaceínico;

(4-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

(4-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, teniendo la proteína la función de convertir un dímero de imina de IPA en ácido prodeoxi-violaceínico; y

(4-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, teniendo la proteína la función de convertir un dímero de imina de IPA en ácido prodeoxi-violaceínico.

[5]

Un vector que incluye un gen VioA, un gen VioB, un gen VioC, un gen VioE o cualquier combinación de estos, en el que el gen VioA se selecciona del grupo que consiste en:

(1-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

(1-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir el L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA);

(1-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

(1-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, teniendo la proteína la función de convertir L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA); y

(1-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO: 2, teniendo la proteína la función de convertir el L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA),

el gen VioB se selecciona del grupo que consiste en:

(2-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3;

(2-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA;

(2-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;

(2-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, teniendo la proteína la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA; y

(2-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, teniendo la proteína la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA,

el gen VioC se selecciona del grupo que consiste en:

(3-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5;

(3-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir el ácido prodeoxiviolaceínico en ácido deoxiviolaceínico;

(3-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(3-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, teniendo la proteína la función de convertir el ácido pro-desoxi-violaceínico en ácido desoxi-violaceínico; y

(3-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 6, teniendo la proteína la función de convertir el ácido prodeoxi-violaceínico en ácido deoxi-violaceínico, y

el gen VioE se selecciona del grupo que consiste en:

(4-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7;

(4-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir un dímero de imina IPA en ácido pro-deoxi-violaceínico;

(4-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

(4-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, teniendo la proteína la función de convertir un dímero de imina de IPA en ácido prodeoxi-violaceínico; y

(4-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, teniendo la proteína la función de convertir un dímero de imina de IPA en ácido prodeoxi-violaceínico.

[6]

El vector según el punto 5, que incluye además el gen VioA y un promotor vinculado al gen VioA y configurado para funcionar como un promotor específico de pétalos, en el que el promotor se selecciona entre un promotor del gen de la antocianidina sintasa derivado de *lisianthus* (SEQ ID NO: 9), un promotor del gen de la dihidroflavonol 4-reductasa derivado de la campanilla (SEQ ID NO: 10), o un promotor del gen de la calcone sintasa derivado de la rosa (SEQ ID NO: 11).

[7]

El vector según 5 o 6, que incluye además una región no traducida (5'-UTR) derivada del gen de la alcohol deshidrogenasa (ADH) de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) unida de manera operativa al gen VioA, al gen VioB, al gen VioC y/o al gen VioE.

[8]

Una planta transgénica o su progenie endogámica o exogámica, que incluye un gen VioA, un gen VioB, un gen VioC, un gen VioE o cualquier combinación de estos, en la que el gen VioA se selecciona del grupo que consiste en:

(1-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

(1-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir el L-triptófano en imina del ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA);

(1-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

(1-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, teniendo la proteína la función de convertir L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA); y

(1-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, teniendo la proteína la función de convertir el L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA),

el gen VioB se selecciona del grupo que consiste en:

(2-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3;

(2-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA;

(2-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;

(2-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, teniendo la proteína la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA; y

(2-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, teniendo la proteína la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA,

el gen VioC se selecciona del grupo que consiste en:

(3-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5;

(3-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir el ácido prodeoxiviolaceínico en ácido deoxiviolaceínico;

(3-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(3-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, teniendo la proteína la función de convertir el ácido pro-desoxi-violaceínico en ácido desoxi-violaceínico; y

(3-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, teniendo la proteína la función de convertir el ácido prodeoxi-violaceínico en ácido deoxi-violaceínico, y

el gen VioE se selecciona del grupo que consiste en:

(4-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7;

(4-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir un dímero de imina IPA en ácido pro-deoxi-violaceínico;

(4-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

(4-d) un polinucleótido que codifica una proteína constituida por una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, y cuya proteína tiene la función de convertir un dímero de imina de IPA en ácido prodeoxiviolacéico; y

(4-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, teniendo la proteína la función de convertir un dímero de imina IPA en ácido prodeoxiviolaceínico.

[9]

La planta transgénica o su progenie endogámica o exogámica según el punto 8, en la que la planta es una rosa, un clavel, un crisantemo o un lirio.

[10]

Un propágulo, un cuerpo vegetal parcial, un tejido o una célula de la planta transgénica o de su progenie endogámica o exogámica según los puntos 8 o 9.

[11]

Una flor cortada de la planta transgénica o de su progenie endogámica o exogámica según los puntos 8 o 9, o una forma procesada creada a partir de la flor cortada.

[12]

Un método para producir una planta transgénica, el cual incluye la introducción del gen según cualquiera de los puntos 1 a 4 o del vector según cualquiera de los puntos 5 a 7 en una célula de una planta que contenga L-triptófano.

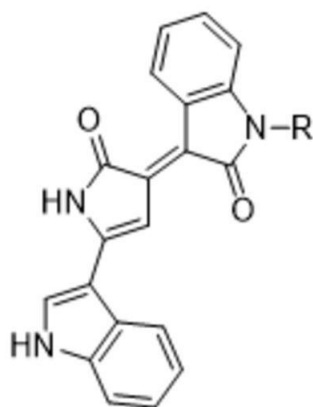
[13]

El método según el punto 12, en el que la planta es una rosa, un clavel, un crisantemo o un lirio.

[14]

Un compuesto representado por la fórmula que se expone a continuación:

[Fórmula 1]



donde, en la fórmula, R es una unidad de monosacárido seleccionada entre glucosa, manosa, galactosa, fucosa, ramnosa, arabinosa, xilosa, fructosa o ácido glucurónico, o una cadena de azúcares formada al unir dos o más de dichas unidades de monosacárido.

[15]

El compuesto según 14, en el que R en la fórmula es glucosa.

[16]

Un colorante que incluye el compuesto según 14 o 15.

[17]

Un producto textil que incluye el colorante según 16.

[18]

Un colorante que incluye el compuesto según 14 o 15.

[19]

Un medicamento, cosmético, alimento o bebida que incluye el compuesto según 14 o 15.

[20]

Un método para producir desoxiviolaceína y/o un glucósido de esta, el método comprende:

introducir el gen según cualquiera de los puntos 1 a 4 o el vector según cualquiera de los puntos 5 a 7 en una célula de una planta que contenga L-triptófano; y recoger el compuesto de la célula.

[21]

El método según el punto 20, en el que el glucósido es el compuesto según el punto 14 o 15.

[22]

El método según 20 o 21, en el que la planta es una rosa, un clavel, un crisantemo o un lirio.

[23]

Una planta o su progenie endogámica o exogámica, que incluye desoxiviolaceína y/o un glucósido de esta.

[24]

La planta o su progenie endogámica o exogámica según el punto 23, en la que el glucósido es el compuesto según el punto 14 o 15.

[25]

La planta o su progenie endogámica o exogámica según cualquiera de los puntos 23 y 24, en la que la planta es una rosa, un clavel, un crisantemo o un lirio.

[26]

Un propágulo, un cuerpo vegetal parcial, un tejido o una célula de la planta o de su progenie endogámica o exogámica según cualquiera de los puntos 23 a 25.

[27]

Una flor cortada de la planta o de su progenie endogámica o exogámica según cualquiera de los puntos 23 a 25, o una forma procesada creada a partir de la flor cortada.

Efectos ventajosos de la invención

[0011]

Según la presente invención, es posible proporcionar una planta transgénica o su progenie endogámica o exogámica, o un propágulo, parte del cuerpo de la planta, tejido o célula de esta, con una alteración del color de la flor, preferiblemente una alteración hacia un color azul. De acuerdo con la presente invención, también es posible proporcionar un compuesto novedoso, la desoxiviolaceína 15N- β -D-glucopiranosida, como pigmento azul natural. El compuesto puede utilizarse como tinte o colorante.

Breve descripción de los dibujos

[0012]

La FIG. 1 ilustra una vía biosintética de las violaceínas utilizando L-triptófano como sustrato de partida.

La FIG. 2 es un diagrama de construcción de un vector binario pSPB8555.

La FIG. 3 presenta un cromatograma de alta resolución de extractos de pétalos de rosas (variedades: Ocean Song (OS), Be Sweet (BS), Nectarine (NT), Lavande (LA), Mondial (MD), Arlene (AL) y WKS82) en las que se ha introducido el pSPB8555.

La FIG. 4 presenta un cromatograma de alta resolución de un extracto de pétalos de clavel (variedad: Durcal (DC)) en el que se ha introducido pSPB8555.

La FIG. 5 es un diagrama de construcción del vector binario pSPB7673.

La FIG. 6 es un diagrama de construcción del vector binario pSPB7674.

La FIG. 7 es un diagrama de construcción de un vector binario pSPB7677.

La FIG. 8 presenta un cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de un extracto de callo de rosa (variedad: Ocean Song) en el que se ha introducido pSPB8555, pSPB7673, pSPB7674 o pSPB7677.

La FIG. 9 presenta un cromatograma de HPLC preparativa (570 nm) de una fracción de metanol al 60 % que contiene un compuesto (I).

La FIG. 10 es un espectro de absorción ultravioleta-visible de un compuesto (I).

La FIG. 11-1 es un espectro de RMN de ^1H de un compuesto (I).

La FIG. 11-2 es un espectro de RMN de ^{13}C del compuesto (I).

La FIG. 12 presenta un cromatograma de HPLC preparativa (570 nm) de una fracción de metanol al 80 % que contiene el compuesto (II).

La FIG. 13 es un espectro de absorción ultravioleta-visible del compuesto (II).

La FIG. 14-1 es el espectro de RMN de ^1H del compuesto (II).

La FIG. 14-2 es el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto (II).

[0013]

La violaceína, un metabolito secundario sintetizado por bacterias gramnegativas como *Chromobacterium violaceum*, es un pigmento azul-violeta natural. Además, la violaceína ha llamado la atención por sus propiedades funcionales, tales como la actividad antitumoral, antibacteriana, antimicrobiana y antiviral. La violaceína se produce a través de cinco pasos de reacciones enzimáticas a cargo de VioA, VioB, VioC, VioD y VioE, utilizando L-triptófano como sustrato de partida.

Tal y como se ilustra en la FIG. 1, VioA actúa como L-triptófano oxidasa y convierte el L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (iminas de IPA). VioB actúa como iminofenilpiruvato dimer sintasa y convierte las iminas de IPA en un dímero de iminas de IPA. VioE convierte el dímero de iminas de IPA en ácido prodeoxi-violaceínico. VioD actúa como triptófano hidroxilasa y convierte el ácido prodeoxi-violaceínico en ácido proviolaceínico. VioC actúa como una monooxigenasa dependiente de FAD y convierte el ácido proviolaceínico en ácido violaceínico. A continuación, la violaceína se genera de forma no enzimática a partir del ácido violaceínico.

La desoxiviolaceína, un análogo estructural de la violaceína, se genera de forma no enzimática a partir del ácido desoxiviolaceínico mediante cuatro reacciones enzimáticas, con la excepción de VioD.

[0014]

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que los codones de los cuatro genes Vio necesarios para la biosíntesis de la desoxiviolaceína derivada de *Chromobacterium violaceum*, es decir, un gen VioA, un gen VioB, un gen VioC y un gen VioE, se optimizan a partir de la información genómica de la rosa y se introducen en células de una planta que contiene L-triptófano, lo que permite crear una planta transgénica con una alteración del color de la flor, preferiblemente una alteración hacia un color azul.

[0015]

El gen VioA utilizado en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en los siguientes polinucleótidos:

(1-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

(1-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir el L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (IPA imina);

(1-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(1-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, teniendo la proteína la función de convertir L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA); y

(1-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, teniendo la proteína la función de convertir L-triptófano en imina de ácido indol-3-pirúvico (imino-IPA).

[0016]

El gen VioB utilizado en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en los siguientes polinucleótidos:

(2-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3;

(2-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA;

(2-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

(2-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, teniendo la proteína la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA; y

(2-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con un 90 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, teniendo la proteína la función de convertir la imina de IPA en un dímero de imina de IPA.

[0017]

El gen VioC utilizado en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en los siguientes polinucleótidos:

(3-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5;

(3-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir el ácido prodeoxiviolaceínico en ácido deoxiviolaceínico;

(3-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(3-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, teniendo la proteína la función de convertir el ácido pro-desoxi-violaceínico en ácido desoxi-violaceínico; y

(3-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o más con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, teniendo la proteína la función de convertir el ácido prodesoxi-violaceínico en ácido desoxi-violaceínico.

[0018]

El gen VioE utilizado en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en los siguientes polinucleótidos:

(4-a) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7;

(4-b) un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con otro polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, en el que el polinucleótido codifica una proteína que tiene la función de convertir un dímero de imina de IPA en ácido prodeoxiviolaceínico;

(4-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

(4-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos están eliminados, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, la proteína tiene la función de convertir un dímero de imina IPA en ácido prodeoxiviolaceínico; y

(4-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o más con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, teniendo la proteína la función de convertir un dímero de imina de IPA en ácido prodesoxi-violaceínico.

[0019]

Una región no traducida 5' (5'-UTR) derivada del gen de la alcohol deshidrogenasa (ADH) de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) puede añadirse como potenciador de la traducción al gen VioA, al gen VioB, al gen VioC y al gen VioE, o a un homólogo de estos.

[0020]

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término «polinucleótido» se refiere al ADN o al ARN.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término «condiciones estrictas» se refiere a condiciones que permiten la unión específica entre un polinucleótido u oligonucleótido y el ADN genómico de manera selectiva y detectable. Las condiciones estrictas se definen mediante una combinación adecuada de concentración de sal, disolvente orgánico (por ejemplo, formamida), temperatura y otras condiciones conocidas. Es decir, la rigurosidad aumenta al reducir la concentración de sal, al aumentar la concentración de disolvente orgánico o al aumentar la temperatura de hibridación. Además, las condiciones de lavado posteriores a la hibridación influyen en la rigurosidad. Estas condiciones de lavado también se definen por la concentración de sal y la temperatura, y la rigurosidad del lavado aumenta al disminuir la concentración de sal y al aumentar la temperatura. Por lo tanto, el término «condiciones estrictas» se refiere a condiciones tales que la hibridación específica solo tiene lugar entre secuencias de nucleótidos con una alta identidad, como un grado de «identidad» entre las secuencias de nucleótidos de aproximadamente el 80 % o más, preferiblemente de aproximadamente el 90 % o más, más preferiblemente de aproximadamente el 95 % o más, aún más preferiblemente del 97 % o más, y lo más preferiblemente del 98 % o más, en promedio. Entre los ejemplos de las «condiciones estrictas» se incluyen condiciones a una temperatura de 60 °C a 68 °C, una concentración de sodio de 150 a 900 mM, preferiblemente de 600 a 900 mM, y un pH de 6 a 8, y entre los ejemplos específicos se incluye la hibridación en condiciones de 5 × SSC (750 mM de NaCl, 75 mM de citrato trisódico), 1 % de SDS, solución Denhardt 5× al 50 % de formaldehído y 42 °C, y el lavado en condiciones de 0,1× SSC (15 mM de NaCl, 1,5 mM de citrato trisódico), 0,1 % de SDS y 55 °C.

[0021]

La hibridación puede llevarse a cabo según un método conocido en la técnica o un método similar, como el descrito en *Current Protocols in Molecular Biology* (editado por Frederick M. Ausubel et al., 1987). Cuando se vaya a utilizar una biblioteca disponible en el mercado, la hibridación podrá llevarse a cabo según el método descrito en las instrucciones de uso adjuntas. El gen seleccionado mediante hibridación podrá ser de origen natural, como por ejemplo de origen vegetal o de origen no vegetal. El gen seleccionado mediante hibridación podrá ser ADNc, ADN genómico o ADN sintetizado químicamente.

[0022]

En la presente memoria, la expresión «secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden uno o varios aminoácidos» significa una secuencia de

aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden cualquier número de aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 5 y, más preferiblemente, de 1 a 3 aminoácidos. La mutagénesis específica de sitio, un método de ingeniería genética útil ya que permite la introducción de mutaciones específicas en sitios determinados, puede llevarse a cabo de acuerdo con el método descrito en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a ed. , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, y similares. Mediante la expresión del ADN mutante utilizando un sistema de expresión adecuado, es posible obtener una proteína que consista en una secuencia de aminoácidos en la que se hayan eliminado, sustituido, insertado y/o añadido uno o varios aminoácidos.

El polinucleótido puede obtenerse mediante un método conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, un método de síntesis química que utilice el método de fosforamidita, o un método de amplificación de ácido nucleico que utilice una muestra de ácido nucleico vegetal como molde y cebadores diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

[0023]

En la presente memoria, el término «identidad» se refiere a la cantidad (número) de residuos de aminoácidos o nucleótidos que constituyen dos cadenas en una secuencia polipeptídica (o secuencia de aminoácidos) o una secuencia polinucleotídica (o secuencia de nucleótidos) que puede determinarse como idéntica en la relación de compatibilidad entre los residuos de aminoácidos o los nucleótidos, lo que significa el grado de correlación de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas o dos secuencias polinucleotídicas, y el término «identidad» puede calcularse fácilmente. Se conocen numerosos métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, y el término «identidad» es bien conocido por los expertos en la materia (por ejemplo, véase Lesk, A. M. (Ed.), *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, Nueva York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Academic Press, Nueva York, (1993); Griffin, A. M. y Griffin, H. G. (Ed.), *Computer Analysis of Sequence Data: Part I*, Human Press, Nueva Jersey, (1994); von Heinje, G., *Análisis de secuencias en biología molecular*, Academic Press, Nueva York, (1987); y Gribskov, M. y Devereux, J. (eds.), *Introducción al análisis de secuencias*, M-Stockton Press, Nueva York, (1991)).

[0024]

Además, los valores numéricos de «identidad» utilizados en la presente memoria, salvo que se especifique lo contrario, pueden ser los valores numéricos calculados mediante un programa de búsqueda de identidad conocido por los expertos en la materia, pero son preferiblemente valores numéricos calculados utilizando el programa ClustalW de MacVector

Application (versión 18.2.5, Oxford Molecular Ltd., Oxford, Inglaterra). En la presente invención, el grado de «identidad» entre secuencias de polinucleótidos o secuencias de aminoácidos es, por ejemplo, de aproximadamente el 90 % o más, preferiblemente de aproximadamente el 95 % o más, más preferiblemente de aproximadamente el 97 % o más, y más preferiblemente de aproximadamente el 98 % o más.

[0025]

El polinucleótido (ácido nucleico, gen) de la presente invención «codifica» una proteína de interés. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término «codifica» significa que la proteína de interés se expresa en un estado en el que muestra su actividad. Además, el término «codifica» incluye el significado tanto de codificar una secuencia estructural (exón) que es una sección continua de la proteína de interés, como de codificar a través de una secuencia (intrón).

[0026]

Se puede obtener un gen que posea una secuencia de nucleótidos nativa, por ejemplo, mediante análisis con un secuenciador de ADN. Además, el ADN que codifica una enzima con una secuencia de aminoácidos modificada puede sintetizarse utilizando mutagénesis específica de sitio o PCR, a partir de ADN que posea la secuencia de nucleótidos natural. Por ejemplo, un fragmento de ADN que se vaya a modificar puede obtenerse mediante el tratamiento con enzimas de restricción de ADN natural o ADN genómico, y utilizarse como molde para la mutagénesis específica de sitio o la PCR utilizando cebadores con la mutación deseada, a fin de obtener un fragmento de ADN que presente la modificación deseada. A continuación, el fragmento de ADN que presenta la mutación puede unirse a un fragmento de ADN que codifique otra porción de la enzima diana.

Alternativamente, con el fin de obtener ADN que codifique una enzima consistente en una secuencia de aminoácidos acortada, el ADN que codifique una secuencia de aminoácidos más larga que la secuencia de aminoácidos objetivo, como la secuencia de aminoácidos completa, puede cortarse con una enzima de restricción deseada, y si el fragmento de ADN obtenido no codifica la secuencia completa de aminoácidos objetivo, entonces puede sintetizarse un fragmento de ADN que consista en la secuencia de la porción faltante y unirse al mismo.

[0027]

Mediante la expresión del polinucleótido obtenido utilizando un sistema de expresión génica en *Escherichia coli* o levadura y la medición de la actividad enzimática, es posible confirmar que el polinucleótido obtenido codifica una proteína con la actividad deseada.

[0028]

El vector de la presente invención incluye un gen VioA, un gen VioB, un gen VioC, un gen VioE o cualquier combinación de estos, y el vector es típicamente un vector de expresión.

[0029]

El vector de expresión de la presente invención incluye una región de control de la expresión (por ejemplo, un promotor, un terminador y/o un origen de replicación) dependiendo del tipo de huésped en el que se vaya a introducir el vector de expresión. Entre los ejemplos de promotores que expresan de forma constitutiva un polinucleótido en una célula vegetal se incluyen un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor El₂35S que tiene dos regiones potenciadoras del promotor 35S unidas entre sí, un promotor del gen rd29A, un promotor rbcS y un promotor mac-1. Para la expresión génica específica de un tejido, puede utilizarse un promotor para un gen expresado específicamente en dicho tejido.

[0030]

El vector de la presente invención incluye preferiblemente además un gen VioA y un promotor unido al gen VioA que funciona como promotor específico de pétalos. Dicho promotor se selecciona, por ejemplo, entre un promotor del gen de la antocianidina sintasa derivado del lisianthus (SEQ ID NO: 9), un promotor del gen de la dihidroflavonol 4-reductasa derivado de la campanilla (SEQ ID NO: 10), o un promotor del gen de la calcona sintasa derivado de la rosa (SEQ ID NO: 11).

[0031]

El vector puede producirse mediante un método conocido utilizando una enzima de restricción, una ligasa o similares. La transformación de una planta huésped con un vector de expresión también puede llevarse a cabo según un método conocido.

[0032]

En el estado actual de la técnica, puede utilizarse una técnica para introducir un vector según la presente invención en una planta y expresar de forma constitutiva o específica de tejido un polinucleótido presente en el vector. El ADN puede introducirse en una planta mediante un método conocido por los expertos en la materia, como el método de *Agrobacterium*, el método de vector binario, el método de electroporación, el método PEG o el método de pistola de partículas.

[0033]

En la presente invención, la planta que puede utilizarse como huésped no está particularmente limitada, siempre que la célula contenga L-triptófano, un sustrato de partida en la biosíntesis de las violaceínas; sin embargo, pueden utilizarse plantas pertenecientes al género *Rosaceae* (*Rosa*), *Caryophyllaceae* (*Dianthus*), *Compositae* (*Chrysanthemum*) o *Liliaceae*

(Lilium), típicamente la rosa, el clavel, crisantemo o lirio, y de forma particularmente preferida la rosa cultivada (nombre científico: *Rosa hybrida*). El término «planta de rosa», tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un cultivar de rosa del género *Rosa* de la familia Rosaceae (nombre científico: *Rosa hybrida*), en términos de clasificación taxonómica. Las rosas se clasifican principalmente en rosas de té híbridas, floribunda y polyantha en función de su porte y del tamaño de la flor. El tipo de planta de rosa utilizada como huésped para la presente invención no está particularmente limitado, y cualquiera de las variedades o líneas puede utilizarse adecuadamente. Entre los ejemplos de variedades de rosa que pueden utilizarse como huéspedes se incluyen Ocean Song, Be Sweet, Nectarine, Lavande, Mondial, Arleene, WKS82, Noblesse, Rita Perfumera, Cool Water, Fame, Topless y Peach Avalanche.

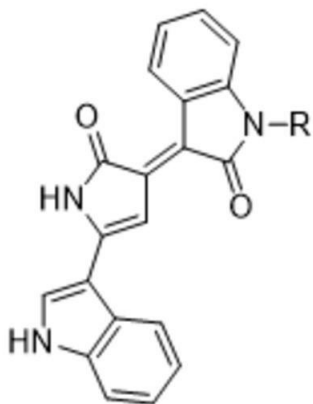
[0034]

Según la presente invención, se introduce un gen VioA, un gen VioB, un gen VioC, un gen VioE o cualquier combinación de estos, por lo que se acumulan en las células pigmentos azules, las violaceínas (por ejemplo, la desoxi-violaceína o un glucósido de esta), creando así una planta transgénica con alteración del color de la flor, preferiblemente una rosa, un clavel, crisantemo o una planta de lirio. El color de la flor alterado es preferiblemente un color azul, por ejemplo, un color de flor del grupo Azul o del grupo Violeta-Azul en la carta de colores RHS, y/o un color de flor que tenga un ángulo de matiz de 339,7° a 270,0°, preferiblemente de 315° o menos en el sistema de colores CIEL*a*b*.

[0035]

El glucósido de la desoxiviolaceína puede representarse, por ejemplo, mediante la siguiente fórmula:

[Chem. 2]



En esta fórmula, R puede ser, por ejemplo, una unidad de monosacárido seleccionada entre una aldosa, como la glucosa, la manosa, la galactosa, la fucosa, la ramnosa, la arabinosa o la xilosa; una cetosa, como la fructosa; y el ácido glucurónico, un tipo de ácido urónico.

Alternativamente, R puede ser una cadena de azúcares formada al unir dos o más unidades de monosacáridos de estas.

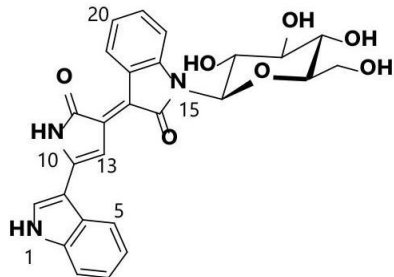
[0036]

Además, la presente invención se refiere también a la planta transgénica o a su progenie endogámica o exogámica obtenida anteriormente, a un propágulo, a una parte del cuerpo de la planta, a un tejido o a una célula de esta, o a una flor cortada o a una forma procesada creada a partir de la flor cortada (en particular, un producto procesado a partir de la flor cortada). En este caso, los ejemplos del producto procesado a partir de la flor cortada incluyen, entre otros, una flor prensada utilizando la flor cortada, una flor preservada, una flor seca y un producto sellado con resina.

[0037]

Además, el solicitante ha aislado y purificado un pigmento azul, un compuesto desconocido acumulado en las células de una rosa, además de la desoxiviolaceína, mediante la introducción de los genes VioA, VioB, el gen VioC y el gen VioE en las células, y ha logrado identificar el pigmento azul como un compuesto (es decir, la desoxiviolaceína 15N-β-D-glucopiranosida) representado por la siguiente fórmula.

[Chem. 3]



[0038]

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere también a un método para producir desoxiviolaceína o un glucósido de esta, en particular el compuesto novedoso (es decir, desoxiviolaceína 15N-β-D-glucopiranosida), método que incluye las etapas de: introducir los genes descritos anteriormente según la presente invención o el vector según la presente invención en células vegetales; y recoger el compuesto de las células. Los compuestos pueden recogerse de las células vegetales utilizando técnicas de extracción tradicionales en la técnica.

[0039]

La presente invención se refiere también a una planta transgénica o a su progenie endogámica o exogámica, un propágulo, un cuerpo vegetal parcial, tejido o célula de esta, o una

flor cortada o una forma procesada creada a partir de la flor cortada (en particular, un producto procesado a partir de una flor cortada), que contenga desoxiviolaceína o un glucósido de esta (por ejemplo, desoxiviolaceína 15N- β -D-glucopiranosida).

[0040]

Además, la presente invención se refiere al compuesto novedoso (es decir, la desoxiviolaceína 15N- β -D-glucopiranosida) per se. El compuesto según la presente invención puede utilizarse como colorante para teñir un producto textil de color azul. El compuesto de la presente invención puede utilizarse como colorante para dar color azul a un medicamento, un cosmético, un alimento o una bebida.

[0041]

Además, dado que se sabe que las violaceínas poseen una actividad antimicrobiana de amplio espectro contra organismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Mycobacterium*, *Neisseria* y *Pseudomonas*, así como actividad antioxidante, antitumoral, antiviral y antiprotzoaria, el compuesto (es decir, la desoxiviolaceína 15N- β -D-glucopiranosida) según la presente invención puede utilizarse como tal ingrediente activo en un medicamento o un cosmético.

[0042]

A continuación, se describirá detalladamente la presente invención con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1

[0043]

[Ejemplo 1: Obtención del gen completo de la desoxiviolaceína sintasa]

Los cuatro genes VioA, VioB, VioC y VioE necesarios para la síntesis de la desoxiviolaceína se optimizaron en cuanto a codones para su expresión en la rosa, basándose en la secuencia de *Chromobacterium violaceum* (VioA: WP_011136821.1, VioB: AVR55196.1, VioC: WP_011136819 y VioE: WP_011136817.1) publicadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica de la Biblioteca Nacional de Medicina, con el fin de obtener secuencias completas mediante síntesis génica artificial, a las que se denominó RhcVioA, RhcVioB, RhcVioC y RhcVioE, respectivamente. Las secuencias son las siguientes.

[0044]

La secuencia de nucleótidos de RhcVioA es la siguiente.

atgaagcacagttcggatatctgcatagttggggccggtatatcaggacttacatgtgcctcgcatctcttgacagtcagcatgtaggggt
ctttctctccgcatctttgacatgcaacaagaagccggaggccgaattaggtccaagatgcttgacggaaaagcctcgattgagttgggtgc
tggtaggtatagccctcagttgcatcctcactccaatctgccatgcagcactacagtcagaagagtgggtctacccgtttacgcaactcaa

gttcaagagccacgttcaacagaagctcaaacgcgctatgaacgagttgagtgccagattgaaggagcatgggaaagagtccttcttgca
gttcgtgtcccataccaagggcatgatagcgcatgagcagtgattcgctcaatgggctatgatgcccttttctcccgacattccgccgag
atggcatatgacatagtgggcaaacaccccgaaatccagtctgttaccgacaatgacgcaaaccagtggtttgagcagagactggctttg
caggactgattcaggggattaaggcaaagggttaaggctgctggagcccgtttctcgctgggttatcggtctttcagttcgacagatgggg
atggctacttggtacaattagcaggtgatgatggttgaaactcgagcacagaactaggcacttgatactgccattccaccgtctgctatgg
ctggcctgaatgtcgactttctgaggttggtctgggctagatacgggagcttgctctcttcaagggttttgacctacggtgaaccatg
gtggctcgactacaaactgacgatcaagtcttgatcggtgacaatccgcttaggaagatctacttcaagggggataagtaccttcttcta
caccgactccgaaatggccaactactggagaggttgcgtagctgaggggtgaggacgggtacttggaacagatccgtacacatctcgcttct
gcgctagggatcgctgagcgtattcctcaaccgttagctcacgtgcacaaatactgggcacatggtgtcgagttttgctgggattctgac
attgaccacccttctgcccttcacatcgggattcaggaattatcgctgtagcgatgcatactgagcattgtggttgatggaaggaggg
ttactaagtgtcgggaagcttcacgtttgctactgcaacgaattgcagcctaa (SEQ ID NO: 1)

[0045]

La secuencia de aminoácidos de RhcVioA es la siguiente.

MKHSSDICIVGAGISGLTCASHLLDSPACRGLSLRIFDMQQEAGGRIRSKMLDGKASI
ELGAGRYSPQLPHFQSAMQHYSQKSEVYPFTQLKFKSHVQQKLKRAMNELSPRLK
EHGKESFLQFVSRYQGHDSA VGMIRSMGYDALFLPDISAEMAYDIVGKHPEIQSVTD
NDANQWFAAETGFAGLIQGIKAKVKAAGARFSLGYRLLSVRTDGDGYLLQLAGD
DGWKLEHRTRHLILAIPPSAMAGLNVD FPEAWSGARYGSLPLFKGFLTYGEPWWL
DYKLDDQVLIVDNPLRKIYFKGDKYLFFYTDSEMAN YWRGCVAEGEDGYLEQIRT
HLASALGIVRERIPQPLAHVHKYWAHGV EFCRDS DIDHPSALSHRDSGIIACSDAYTE
HCGWMEGGLLSAREASRLLLQRIAA* (SEQ ID NO: 2)

[0046]

La secuencia de nucleótidos de RhcVioB es la siguiente.

atgtcgatcttgactttcctcgatccacttcaggggttggtcggtcaatgctccgactgccaatcgcatccgcatggacacattgata
tggcgtctaatacagttgcaatggcaggggagccgtttgattggccagacatccaactgagtttcacagacatttgcttcttgggtccccg
ctttggcctcgatggccgagccgatcccgaaggaccgttttagtctggcagaaggctacaacgctgccggtacaacacacttcttgggag
agtgccacgggtgtctcacgttcagtgaggacgggggtgaggcagaccgcggagatggactggtcggtgctagactcgctcttggggtcatt
acaatgtttaccttcgcacaacgtttaatcgggctaggtgggtggatagcgatccaaccagaagagacgctgcacagatctatgctggccaa
ttcacatctcgctgcaggtgctggacctggaacccgtggctcttcacagctgacatcgacgacagtcaggtgctcgatggaccagag
gtgggcatattgccgagcgtggtggacatttctggacgaggagtttggcttggctcgcttgggtttcaattctcgtgccaaggacctcctca
cttcttgggtcaccctgggtcccttggactcagaagcctggcgaggtccagcttgcctcgcagagatgacgacgttctcggttgactgttcagt
acgcattgttcaacatgtctactcctccgaacccaattccccgggtttccatgatattggtggggtagtcggactttggcgtagggggcgaact
tgccagttatctgcagggcggttacttcggcctaggcaacccgggttgggtgacttgaccttgcgtgtgaatggcggtagagtcgctctgaa
ccttgcctgtgcaattcattcttactcgagccgctcagccgtcggcaccggaccgcctcacaccggacttagggggcaaagctgcctcttg

gggacttacttctcagggacgaggatggtgccttgctggcaaggggtccacaggccctttaccaggactactggacgaatcatgggatagt
tgacttgcccttgcttagagaaccacgcggctctctaaccttaagtagcgagctagccgaatggcgggagcaggattgggtcactcagtca
gatgccagtaacctttacctcgaggctcctgatcgaagacacggaagatttttcccagtcgattgcccttcgctcatacttccgtggggag
gcaagagccagacctgacattccccacgtatcgaaggcatgggcctcgttggtgtggaatcacgtcaagacggggatgccgcagagt
gcggttgacaggggtaaggcctggctcgtcgtatcgtgctagatgatggggccgaggccataccctgagggtactcccggacgattgg
gcattagacgatccacagtcgaggaggtagactacgctttttgtaccgtcatgttatggcgtattacgaactcgtgtaccgttcatgagcg
acaaagtgttcagcctagccgacaggtgcaagtgcgaaacttacgcccgccttatgtggcagatgtgtgatccgaaaaccgcaacaagt
cctactacatgccctctacccgagagttgtctgctcgaagctcgaactgttctcaagtacctcgtcacgtggagggccaagctagactc
caagcacctccacccgaggaccggctcgatagagagtaaggcacaactcgcagctgaacttagaaaggctgtggatttggaattaag
cgtgatgcttcagtacttgtatgccgcttactccattcccaactatgcacagggtcagcaacgtgtcagggacggggcttgaccgccgagc
aactgcaacttgcttggggtctgggtgatagacgacgtgacggaggtatcagggccgctttactagagatagcccacgaggagatgatcca
ctacttggtcgttaacaactgttgatggcccttgccgaacccttttacgccgagtagcgttgatggggcgaagcagcacgtcaagcattcgg
attggatacagagttcgcgtagagcctttcagtgaagtcaactctcgcacgtttcgtccgacttgaatggcctcacttctctcgtccggg
aagtaattgctgactgctacgccgctattcggcaagcctttctggatttaccggaccttttggggagaagctggtaaaccggcgaggaga
gcaccacctatttctcaatgagctgacaaaccgtgcacatcctgggtatcagttggagggtgttgacagggactccgctctctcgggtattgcc
tttgttaccgatcaaggggaaggggtgccttagactcacctcactatgagcattccatttccagaggctccgtgagatgtccgcacgcac
atggcccaatctgctccattcgaacctgccctacctgcactccgtaaccccgctttggatgagtcaccagggtgtcaagggttgccgacgg
aagagccagggcactcatggctctgtaccaaggcgtttatgagcttatgttcgcaatgatggcccaacactttgcagtgaaccactcggta
gtcttcgaagggtcacgtcttatgaatgcagccattgacctcatgactgggcttttggcctctcagctgtgcattgatgaatttccttctggg
attgcaggacgaactccgggtccaccattgccggggccaggtgacacccgttcgtacgatgactacgccttgggggtgctgatgctcgctcg
ccgctgcgagcggctcctggaacaggcaagcatgttgaggcctgggtggctgccagatgcacagatggagctgctggatttctaccgaag
gcagatgctcgatctagcttgtgaaagtatccgggaggcctaa (SEQ ID NO: 3)

[0047]

La secuencia de aminoácidos de RhcVioB es la siguiente.

MSILDFPRIHFRGWARVNAPTANRDPHGHIDMASNTVAMAGEPFDLARHPTEFHR
HLRSLGPRFGLDGRADPEGPFSLAEGYNAAGNNHFSWESATVSHVQWDGGEADR
GDGLVGARLALWGHYNDYLRTTFNRRARWVSDPTRRDAAQIYAGQFTISPAGAG
PGTPLFTADIDDSHGARWTRGGHIAERGGHFLDEEFGLARLFQFSVPKDHPHFLFH
PGPFDSEAWRRLQLALEDDDDVLGLTVQYALFNMSTPPQPNSPVFHDMVGVVGLWR
RGELASYPAGRLLRPRQPGLGDLTLRVNGGRVALNLACAIPFSTRAAQPSAPDRLTP
DLGAKLPLGDLLLRLDEDGALLARVPQALYQDYWTNHGIVDLPLLREPRGSLTSSSE
LAEWREQDWWTQSDASNLYLEAPDRRHGRFFPESIALRSYFRGEARARPDIPHRIEG
MGLVGVESRQDGDAAEWRLTGLRPGPARIVLDDGAEAIPLRVLPDDWALDDATVE
EVDYAFLYRHVMAYYELVYPFMSDKVFSLADRCKCETYARLMWQMCDPQNRNKS

YYMPSTRELSAPKARLFLKYLAHVEGQARLQAPPPAGPARIESKAQLAAELRKAVD
LELSVMLQYLYAAYSIPNYAQGGQQRVRDGAWTAEQLQLACGSGDRRRDGGIRAAL
LEIAHEEMIHVLLVNNLLMALGEPFYAGVPLMGEAARQAFGLDTEFALEPFSESTL
ARFVRLEWPHFIPAPGKSIADCYAAIRQAFLDLPDLFGGEAGKRGGEHHLFLNELT
NRAHPGYQLEVFDRDSALFGIAFVTDQGEAGALDSPHYEHSFQRLREMSARIMA
QSAPFEPALPALRNPVLDESPGCQRVADGRARALMALYQGVYELMFAMMAQHFA
VKPLGSLRRSRLMNAIDLMTGLLRPLSCALMNLPSTGIAGRTAGPPLPGPVDTRSVD
DYALGCRMLARRCERLLEQASMLEPGWLPDAQMELLDYFRRQMLDLACGKLSRE
A* (SEQ ID NO: 4)

[0048]

La secuencia de nucleótidos de RhcVioC es la siguiente.

atgaagcgtgcaatcattgtgggaggaggacttgacgggggcttgacagctatctatctagccaaacgcggttatgaggtccatgtggtga
gaaacgtggtgacctctacgtgacttgagcagttacgtggatgtcgtttctctagagctatcggtgtgtccatgacagttcgtgggatcaaa
tcagtcctcgctgctgggattcctcgctgaactcgatgcattgtggaaccgatagtcgctatggcattcagtggtgggagggcagtatcgg
atgaggaggtgaagcccttagaggactttcgccactgagctgaatcgagctgcctttcaaaagctgtgaacaagtacgccaacttagc
tggagtacgtactactcgagcacaatgcctcgatggatcttgatggaaagtcggttctcattcagggaagatgggcaacctcaaa
ggctgcaaggtgacatgatcatcggtgccgatggtgcacactctgccgttcgccaggctatgcaatccggcttgagacgtttcgagttcaa
cagaccttcttcgcatgggtacaagaccttggttcttcagacgctcaagcactaggttacaggaaggatacgtgtacttttcggcatg
gatagtgggggacttttccggttagagctgcaaccataccgatgggtccgtaagcattgccgtttgtctccatactcgggctcaccttca
ctgactactactgacgagcctactatgcgagccttttcgaccgttactttggcggtttacctagagacgcagagacgaaatgcttcgtcagt
tccttgccaaaccgttcaatgacctcattaacgttcggtcttcgactttccactacaagggtaacgtgctcctcttgggagatgcagcacatgc
cacagcacccttttggggcaagggtgaatatggccttagaagacgcgagaacgttcgttgagctcttgaccgacatcaaggggatca
ggacaaaagcctttcccgagttaccgagttgaggaaggtccaagctgacgcaatgcaagacatggctagggccaaactatgacgtgctttca
tgttgaaccccttttctcatgagggcacggtacacacggtacatgcactctaagttccgggcttgatccgctgatatggccgagaag
ctctacttcaccagtgaaaccatacgaatgacgagcagatacagcggaagcagaatgtgtggtacaagattggtagggtcaattaa

(SEQ ID NO: 5)

[0049]

La secuencia de aminoácidos de RhcVioC es la siguiente.

MKRAIIVGGGLAGGLTAIYLAKRGEVHVVEKRGDPLRDLSSYVDVVSRAIGVSMT
VRGIKSVLAAGIPRAELDACGEPIVAMAFSVGGQYRMRELKPLEDFRPLSLNRAAFQ
KLLNKYANLAGVRYFFEYHKCLDVDLDGKSVLIQKGKDGQPQRLQGDMIIIGADGAHS
ARQAMQSGLRRFEFQQTFFRHGYKTLVLPDAQALGYRKDTLYFFGMDSGGLFAG
RAATIPDGSVSIACVCLPYSGSPSLTTTDEPTMRAFFDRYFGGLPRDARDEMLRQFLA
KPSNDLINVRSTFHYKGNVLLLGDAAHATAPFLGQGMNMALEDARTFVELLDRH

QGDQDKAFPEFTELKRVQADAMQDMARANYDVLSCSNPIFFMRARYTRYMHSKF
PGLYPPDMAEKLYFTSEPYDRLQQIQRKQNVWYKIGRVN* (SEQ ID NO: 6)

[0050]

La secuencia de nucleótidos de RhcVioE es la siguiente.

atggagaatcggaaccaccgtgtgtgccggttagatggccagtgcatagctgtctactgggtcacctatgctacctgacgaccaacttac
ctctgggtactgttggtcgactacgaacgggacatctgcaggatagacggcctgtttaaccctggagtgagcgcgatacaggctatcgc
ctctggatgtccgaggtagggaatgctgcatctggaaggacctggaagcagaagggtgcctatgggagagaacggactgcattgggtgag
cagctttgtgagcgtccactggacgatgagacaggctcctttgccgagcttttctctcgcgagacgtttgcgaagactcgggtcgtcac
attgggcgtagggtgtcttaggtcgtgaagccgatggatggcgctaccaacgtcctggcaaaggctcctagcactctctacctcgatgcagc
ctctgggactccgttacggatggttacgggagatgaggctagcagggcatcgttcgagactcccaaactgtcagaagccgagattccc
gatgctgtgtttgctgccaagagataa (SEQ ID NO: 7)

[0051]

La secuencia de aminoácidos de RhcVioE es la siguiente.

MENREPPLLPARWSSAYVSYWSPMLPDDQLTSGYCWFDYERDICRIDGLFNPWSER
DTGYRLWMSEVGNAASGRTWKQKVAYGRERTALGEQLCERPLDDETGPFAELFL
PRDVLRLRGARHIGRRVVLGREADGWRYQRPKGKGPSTLYLDAASGTPLRMVTGDE
ASRASLR DFPNVSEAEIPDAVFAAKR* (SEQ ID NO: 8)

[0052]

[Ejemplo 2: Expresión transitoria del clúster de genes de síntesis de desoxiviolaceína en pétalos de rosa]

Con el fin de confirmar si los genes RhcVioA, RhcVioB, RhcVioC y RhcVioE del clúster de genes de síntesis de desoxiviolaceína tienen actividad de síntesis de desoxiviolaceína en pétalos de rosa, se construyó un vector binario pSPB8555 (FIG. 2) en el que se introdujeron los cuatro genes. Este vector tiene pBINPLUS como estructura básica y contiene los siguientes cuatro casetes de expresión.

(1) Promotor El₂35S, ADNc completo de RhcVioA derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 1) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) y un terminador HSP derivado de *Arabidopsis thaliana*

(2) Promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioB derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 3) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) y el terminador del gen de la manopina sintasa (MAS) derivado de *Agrobacterium*

(3) Promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioC con uso de codones modificado derivado de *C. violaceum* (SEQ ID NO: 5) y el terminador MAS derivado de *Agrobacterium*

(4) promotor El₂35S, el ADNc de longitud completa de RhcVioE derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 7) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12)), y el terminador HSP derivado de *Arabidopsis thaliana*

[0053]

Este vector binario expresa de forma constitutiva VioA, VioB, VioC y VioE de *C. violaceum* en plantas.

[0054]

El pSPB8555 así preparado se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens*, y el resultado se introdujo de forma transitoria en pétalos de rosa (variedades: Ocean Song (OS), Be Sweet (BS), Nectarine (NT), Lavande (LA), Mondial (MD), Arleene (AL) y WKS82) de acuerdo con un método conocido de infiltración al vacío descrito, por ejemplo, en Documento no patentado 1. Se confirmó que el color de la flor cambiaba a azul tras almacenarla en un lugar oscuro a 24 °C durante unos 7 días. Se recortó la parte de la muestra que había cambiado a azul, excepto la de WKS82/8555, se liofilizó aproximadamente 0,1 g de la muestra, se añadió a continuación 1 ml de acetonitrilo al 50 % que contenía ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %, y se extrajeron los componentes mediante sonicación durante 20 minutos y se centrifugaron a 10 °C a 3600 revoluciones durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro y, a continuación, se detectó un producto de reacción mediante HPLC (Prominence LC-20AD fabricado por Shimadzu Corporation) en las siguientes condiciones.

Columna utilizada: Shim-pack FC-ODS 4,6 × 150 mm

Solución de disolvente A: TFA al 0,1 %

Solución de disolvente B: acetonitrilo al 90 % con TFA al 0,1 %

Condiciones de la fase móvil: un gradiente lineal de A:B = 80:20 a los 0 minutos a A:B = 30:70 a los 10 minutos, seguido de una retención de 6 minutos; a continuación, un gradiente lineal de vuelta a A:B = 80:20 a los 17 minutos, seguido de una retención de 11 minutos hasta los 28 minutos

Caudal: 0,6 ml/min

Temperatura de la columna: 40 °C

[0055]

Como espectro de absorción, se midió la absorbancia a 570 nm utilizando una matriz de fotodiodos (SPD-M20A). En estas condiciones, la desoxiviolaceína se eluyó a los aproximadamente 12,8 minutos. Tal y como se ilustra en la FIG. 3, se detectó un componente no identificado (tiempo de retención: 8,5 minutos) además de la desoxiviolaceína esperada en esta muestra.

[0056]

[Ejemplo 3: Expresión transitoria del clúster de genes de síntesis de desoxiviolaceína en pétalos de clavel]

Con el fin de confirmar si los genes RhcVioA, RhcVioB, RhcVioC, y RhcVioE del clúster génico de síntesis de desoxiviolaceína tienen actividad para sintetizar desoxiviolaceína en un pétalo de clavel, se introdujo un vector binario pSPB8555 (FIG. 2) en *Agrobacterium tumefaciens* de la misma manera que en el Ejemplo 2, y el resultado se introdujo de forma transitoria en el pétalo de clavel (variedad: Durcal) mediante infiltración al vacío. Como resultado, se detectó la desoxiviolaceína esperada en el clavel, tal y como se observa en la FIG. 4.

[0057]

[Ejemplo 4: Expresión del grupo de genes de síntesis de desoxiviolaceína en la rosa]

Con el fin de confirmar si los genes RhcVioA, RhcVioB, RhcVioC y RhcVioE del grupo de genes de síntesis de desoxiviolaceína tienen actividad de síntesis de desoxiviolaceína en las rosas, se construyeron los vectores binarios pSPB8555 (FIG. 2), pSPB7673 (FIG. 5), pSPB7674 (FIG. 6) y pSPB7677 (FIG. 7) con los cuatro genes introducidos. Cada uno de los vectores tiene pBINPLUS como estructura básica y cuatro casetes de expresión en las siguientes combinaciones.

[0058]

[pSPB8555]

Tal y como se describe en el Ejemplo 2.

[0059]

[pSPB7673]

(1) Promotor del gen de la antocianidina sintasa derivado de *Lisianthus* (SEQ ID NO: 9), ADNc de longitud completa de RhcVioA derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 1) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) y un terminador HSP derivado de *Arabidopsis thaliana*

(2) promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioB derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 3) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen

ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12), y un terminador del gen de la manopina sintasa (MAS) derivado de *Agrobacterium*

(3) Promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioC derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 5), y terminador MAS derivado de *Agrobacterium*

(4) Promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioE derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 7) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) y un terminador HSP derivado de *Arabidopsis thaliana*

[0060]

[pSPB7674]

(1) Promotor del gen de la dihidroflavonol 4-reductasa derivado de la campanilla (SEQ ID NO: 10), ADNc completo de RhcVioA derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 1) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) y un terminador HSP derivado de *Arabidopsis thaliana*

(2) promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioB derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 3) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) y un terminador del gen de la manopina sintasa (MAS) derivado de *Agrobacterium*

(3) Promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioC derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 5), y terminador MAS derivado de *Agrobacterium*

(4) Promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioE derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 7) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) y un terminador HSP derivado de *Arabidopsis thaliana*

[0061]

[pSPB7677]

(1) Promotor del gen de la calcona sintasa derivado de rosa (SEQ ID NO: 11), ADNc completo de RhcVioA derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 1) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) y un terminador HSP derivado de *Arabidopsis thaliana*

(2) promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioB derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 3) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) y un terminador del gen de la manopina sintasa (MAS) derivado de *Agrobacterium*

(3) Promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioC derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 5), y terminador MAS derivado de *Agrobacterium*

(4) Promotor El₂35S, ADNc de longitud completa de RhcVioE derivado de *C. violaceum* con uso de codones modificado (SEQ ID NO: 7) (con la adición de un 5'-UTR derivado del gen ADH de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 12) y un terminador HSP derivado de *Arabidopsis thaliana*

[0062]

Este vector binario expresa de forma constitutiva un gen VioA, un gen VioB, un gen VioC y un gen VioE de *C. violaceum* en plantas.

Los vectores pSPB8555, pSPB7673, pSPB7674 y pSPB7677 así producidos se introdujeron en una variedad de la categoría azul denominada «Ocean Song». Se liofilizó aproximadamente 0,2 g del callo transgénico de rosa resultante; a continuación, se añadió acetonitrilo al 50 % que contenía 1 ml de TFA al 0,1 %, y los componentes se extrajeron mediante sonicación durante 20 minutos y se centrifugaron a 5 ° C a 15 000 revoluciones durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro y, a continuación, se detectó un producto de reacción mediante HPLC (Prominence LC-20AD fabricado por Shimadzu Corporation) en las condiciones descritas en el Ejemplo 2. Como resultado, tal y como se observa en la FIG. 8, se detectó un componente no identificado (tiempo de retención: 8,5 minutos) como componente principal en el callo transgénico de rosa.

[0063]

[Ejemplo 5: Aislamiento del componente no identificado]

1. Preparación del extracto de pétalos

De la misma manera que en el ejemplo 2, se introdujo un vector binario pSPB8555 (fig. 2) en *Agrobacterium tumefaciens*, y las bacterias se introdujeron de forma transitoria en pétalos de rosa (cultivar: Ocean Song) mediante infiltración al vacío. Se extirparon las partes que presentaban un cambio de color azul y se conservaron congeladas a -30 °C.

Los pétalos congelados (62,6 g, peso húmedo) se pulverizaron hasta obtener un polvo, al que se añadieron 300 ml de una solución acuosa de metanol al 80 %, seguida de irradiación ultrasónica a temperatura ambiente durante 40 minutos. Tras separar el extracto del residuo, se añadieron 300 ml de una solución acuosa de metanol al 80 % al residuo y se repitió el procedimiento de extracción anterior.

Además, se añadieron 200 ml de metanol al 80 % al residuo y se repitió la operación de extracción para obtener un total de 800 ml de extracto. El extracto combinado se concentró hasta

150 ml utilizando un evaporador rotatorio mientras se calentaba a una temperatura que no superara los 40 °C.

[0064]

2. Purificación bruta del extracto utilizando Sep-Pak

Se equilibró un cartucho Sep-Pak C18 Plus Long (fabricado por Waters Corporation) con 10 ml de metanol, seguidos de 10 ml de agua, tras lo cual se cargaron en él 10 ml del extracto de pigmento bruto. A continuación, los pigmentos se eluyeron secuencialmente con 10 ml de cada uno de los siguientes: agua, metanol al 40 % (MeOH), metanol al 60 % y metanol al 80 %.

Como resultado, se eluyó un pigmento azul (Compuesto (I)) con metanol al 60 %, y se eluyó un pigmento azul (Compuesto (II)) con metanol al 80 %. La purificación mediante el cartucho Sep-Pak se llevó a cabo en un total de 17 ciclos.

[0065]

3. Condiciones de HPLC preparativa para las fracciones de pigmento azul obtenidas mediante Sep-Pak

En la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) preparativa de las fracciones de pigmento azul obtenidas mediante purificación con Sep-Pak, se emplearon comúnmente las siguientes condiciones.

El sistema de HPLC comprendía un desgasificador (DGU-20A), un inyector automático (SIL-10AP), dos bombas (LC-6AD ×2), un colector de fracciones (FRC-10A), un controlador del sistema (CBM-20A), un detector de matriz de fotodiodos (SPD-M20A), un horno de columna (CTO-20AC) y un software de procesamiento de datos (LabSolutions, versión 5.97), todos ellos fabricados por Shimadzu Corporation.

La columna utilizada fue una columna Inertsil ODS-4 (fabricada por GL Sciences Inc.) con unas dimensiones de 20 mm de diámetro interior × 250 mm de longitud. La fase móvil consistió en un sistema de gradiente binario de (A) una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1 % y (B) acetonitrilo. El caudal se fijó en 8,0 ml/min, y la temperatura del horno de la columna se mantuvo a 40 °C.

El perfil de elución en gradiente se modificó adecuadamente en función de la muestra.

[0066]

4. HPLC preparativa del compuesto (I)

La fracción de metanol (MeOH) al 60 % obtenida mediante purificación con Sep-Pak se concentró utilizando un concentrador SpeedVac (fabricado por Thermo Scientific), con lo que se formó un precipitado. Se añadió metanol hasta que el precipitado se disolvió por completo.

La solución resultante se sometió a HPLC preparativa en porciones de 1,5 ml cada una. Las condiciones del gradiente fueron las siguientes: disolvente B, del 20 % al 30 % (0 a 0,05 min), mantenimiento al 30 % (0,05 a 25 min), del 30 % al 100 % (25 a 26 min), del 100 % al 100 % (26 a 27 min), del 100 % al 20 % (27 a 28 min) y mantenimiento al 20 % (28 a 38 min).

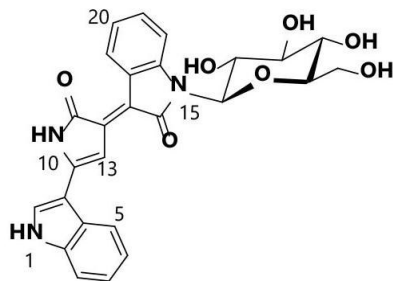
Se utilizó la absorbancia a 570 nm como indicador de purificación. Se recogieron las fracciones con tiempos de retención de 29,2 a 30,3 minutos en el cromatograma mostrado en la FIG. 9, y se eliminó el disolvente orgánico utilizando un concentrador SpeedVac, seguido de liofilización.

Se obtuvo el compuesto (I) como un sólido amorfo azul en una cantidad de 1,5 mg, lo que corresponde a un rendimiento del $2,4 \times 10^{-3}$ %.

[0067]

La estructura de este compuesto se determinó mediante RMN, LC-MS y métodos similares, y se representó mediante la siguiente fórmula (I) ($C_{26}H_{23}N_3O_7$).

[Chem. 4]



[0068]

5. Propiedades físicas del compuesto (I)

Las propiedades fisicoquímicas del compuesto (I) fueron las siguientes.

(1) Espectro de absorción ultravioleta-visible

El espectro de absorción ultravioleta-visible se midió a 25 °C utilizando un espectrofotómetro UV-visible V-650 (fabricado por JASCO Corporation) con una cubeta de cuarzo con una longitud de recorrido óptico de 0,1 mm. Los resultados se muestran en la FIG. 10.

(2) Determinación de la fórmula molecular mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS)

El análisis LC-MS se realizó en modo de iones positivos utilizando un sistema compuesto por un espectrómetro de masas LCMS-IT-TOF, un HPLC Prominence y el software LCMSsolution versión 3.81.

La columna utilizada fue una columna Shim-pack FC-ODS (fabricada por Shimadzu Corporation) con unas dimensiones de 2,0 mm de diámetro interior $\times$ 150 mm de longitud. La fase móvil consistió en (A) una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1 % y (B) una solución acuosa de acetonitrilo al 90 % que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %. La elución en gradiente se llevó a cabo en las siguientes condiciones: disolvente B, retención al 20 % (0 a 0,04 min) , del 20 % al 70 % (0,04 a 10 min), retención al 70 % (10 a 16 min), del 70 % al 20 % (16 a 17 min) y retención al 20 % (17 a 28 min).

El caudal se fijó en 0,4 ml/min, y la temperatura del horno de la columna se mantuvo a 40 °C. Al someter a análisis 10 μ l de un extracto de metanol de pétalos, se observó un pico del compuesto (I) con una absorbancia a 570 nm en un tiempo de retención de 5,3 minutos.

A partir del análisis del espectro de masas, se determinó la fórmula molecular de la siguiente manera: HRMS (ESI, m/z , $[M+H]^+$) Calculada para $C_{26}H_{23}N_3O_7$: 490,1609; Encontrada: 490,1595 (error $-2,86$ ppm).

(3) Espectro de dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular se midió a 25 °C utilizando un espectropolarímetro de dicroísmo circular J-1500 (fabricado por JASCO Corporation) con una cubeta de cuarzo con una longitud de recorrido óptico de 0,1 mm (resultados no mostrados).

(4) Rotación óptica

La rotación óptica se midió a 25 °C utilizando un polarímetro DIP-1000 (fabricado por JASCO Corporation) con una cubeta cilíndrica de cuarzo de 3,5 mm de diámetro $\times$ 100 mm de longitud (resultados no mostrados).

(5) Espectros de RMN

Tras disolver 1,5 mg del compuesto (I) en 0,65 ml de DMSO- d_6 , se realizaron mediciones de RMN utilizando un espectrómetro AVANCE III HD 800 (fabricado por Bruker BioSpin). RMN unidimensional de ^1H y ^{13}C , y RMN bidimensional de ^1H DQF-COSY, ^1H TOCSY, ^1H NOESY, ^1H ROESY, $^1H\{^{13}C\}$ HSQC editado, $^1H\{^{13}C\}$ HMBC, $^1H\{^{13}C\}$ -HMQC-COSY y $^1H\{^{15}N\}$ -HMBC.

Los resultados respectivos se muestran en las FIGS. 11-1 y 11-2.

[0069]

6. HPLC preparativa del compuesto (II)

El compuesto (II), que se eluyó en tiempos de retención de 34,5 a 35,7 minutos durante la purificación por HPLC de la fracción de metanol (MeOH) al 60 % obtenida mediante purificación con Sep-Pak, se combinó con la fracción de MeOH al 80 % y se concentró. Al formarse un precipitado, se añadió metanol hasta que este se disolvió por completo.

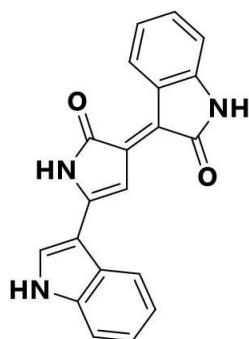
Esta solución se dividió en diez porciones de 3,2 ml cada una y se sometió a purificación utilizando el sistema de HPLC preparativa para pigmentos azules descrito anteriormente, en las siguientes condiciones de elución en gradiente: disolvente B, del 30 % al 50 % (0 a 0,05 min), mantenimiento al 50 % (0,05 a 26 min), del 50 % al 100 % (26 a 27 min), del 100 % al 100 % (27 a 28 min), del 100 % al 20 % (28 a 29 min) y mantenimiento al 20 % (29 a 38 min).

Se recogieron las fracciones eluidas en tiempos de retención de 25,6 a 26,8 minutos en el cromatograma mostrado en la FIG. 12, y se eliminó el disolvente orgánico utilizando un concentrador SpeedVac, seguido de liofilización.

Se obtuvo el compuesto (II) como un sólido amorfo azul en una cantidad de 1,8 mg, lo que corresponde a un rendimiento del $2,9 \times 10^{-3}$ %. [0070]

La estructura de este compuesto se determinó mediante RMN, LC-MS y métodos similares, y se representó mediante la siguiente fórmula (II) ($C_{20}H_{13}N_3O$).

[Chem. 5]



[0071]

7. Propiedades físicas del compuesto (II)

Las propiedades fisicoquímicas del compuesto (II) fueron las siguientes.

(1) Espectro de absorción ultravioleta-visible

El espectro de absorción ultravioleta-visible se midió a 25 °C utilizando un espectrofotómetro UV-visible V-650 (fabricado por JASCO Corporation) con una cubeta de cuarzo con una longitud de recorrido óptico de 0,1 mm. Los resultados se muestran en la FIG. 13.

(2) Determinación de la fórmula molecular mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS)

El análisis LC-MS se realizó utilizando un sistema compuesto por un espectrómetro de masas LCMS-IT-TOF, un HPLC Prominence y el software LCMSsolution (versión 3.81).

La columna utilizada fue una columna Shim-pack FC-ODS (fabricada por Shimadzu Corporation) con unas dimensiones de 2,0 mm de diámetro interior $\times$ 150 mm de longitud. La

fase móvil consistió en (A) una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1 % y (B) una solución acuosa de acetonitrilo al 90 % que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %. La elución en gradiente se llevó a cabo en las siguientes condiciones: disolvente B, mantenimiento al 20 % (0 a 0,04 min), del 20 % al 70 % (0,04 a 10 min), mantenimiento al 70 % (10 a 16 min), del 70 % al 20 % (16 a 17 min) y mantenimiento al 20 % (17 a 28 min).

El caudal se fijó en 0,4 ml/min y la temperatura del horno de la columna se mantuvo a 40 °C. Cuando se sometieron a análisis, sin concentrar, 10 µl de una fracción que contenía el compuesto (II) obtenido mediante purificación por HPLC, se observó un pico del compuesto (II) con un tiempo de retención de 8,6 minutos.

A partir del análisis del espectro de masas, se determinó la fórmula molecular de la siguiente manera: HRMS (ESI, m/z, [M+H]⁺) Calculada para C₂₀H₁₃N₃O: 328,1081; Encontrada: 328,1091 (error +3,05 ppm).

(3) Espectro de dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular se midió a 25 °C utilizando un espectropolarímetro de dicroísmo circular J-1500 (fabricado por JASCO Corporation) con una cubeta de cuarzo con una longitud de recorrido óptico de 0,1 mm (resultados no mostrados).

(4) Rotación óptica

La rotación óptica se midió a 25 °C utilizando un polarímetro DIP-1000 (fabricado por JASCO Corporation) con una cubeta cilíndrica de cuarzo de 3,5 mm de diámetro × 100 mm de longitud (resultados no mostrados).

(5) Espectros de RMN

Tras disolver 1,8 mg del compuesto (II) en DMSO-d₆, se realizaron mediciones de RMN utilizando un espectrómetro AVANCE III HD 800 (fabricado por Bruker BioSpin).

Se llevaron a cabo mediciones de RMN unidimensionales de ¹H y ¹³C, y mediciones bidimensionales de ¹H DQF-COSY, ¹H TOCSY, ¹H NOESY, ¹H ROESY, ¹H{¹³C} HSQC editado, ¹H{¹³C} HMBC, ¹H{¹³C}-HMQC-COSY y ¹H{¹⁵N}-HMBC.

Los resultados respectivos se muestran en las FIGS. 14-1 y 14-2.

[0072]

[Ejemplo 6: Obtención de una planta transgénica de rosa con el clúster de genes sintéticos de desoxiviolaceína introducido]

Se introdujo el pSPB7673 o el pSPB7674 producido en el Ejemplo 4 en una variedad de la categoría azul denominada «Ocean Song», y el callo transgénico de rosa obtenido se sometió a un tratamiento de regeneración mientras se mantenía y propagaba de forma continua para

obtener plantas transgénicas de rosa. Las plantas transgénicas de rosa se cultivaron en un invernadero, y se evaluaron y analizaron los ejemplares en floración.

El análisis de pigmentos de los pétalos se realizó mediante HPLC (Shimadzu, Prominence LC-20AD) en las condiciones descritas en el Ejemplo 2, y se confirmó que las plantas transgénicas de rosa acumulaban desoxiviolaceína, el componente objetivo, como pigmento principal y que también acumulaban el glucósido descrito en el Ejemplo 5. La cantidad de desoxiviolaceína acumulada fue de 0,102 mg como máximo por gramo de peso fresco de pétalo.

Se evaluó el color de cada pétalo utilizando un espectrofotómetro (Minolta CM-700d) . En la línea en la que se acumulaba desoxiviolaceína en los pétalos, se confirmó que el ángulo de matiz (Hue) se había desplazado considerablemente hacia el azul, y que el valor mínimo (λ Min) del espectro de reflexión también se había desplazado hacia el lado de las longitudes de onda largas. En la evaluación visual, se confirmó que los pétalos de la planta huésped eran de color rosa claro, lo que corresponde a 75C (Grupo Púrpura) en la carta de colores de la RHS (Royal Horticultural Society), mientras que los pétalos de las plantas transgénicas de rosa que acumulaban desoxiviolaceína como pigmento principal habían cambiado a azul oscuro, entre los cuales el individuo que presentaba el cambio azulado más pronunciado mostraba un color de flor correspondiente a 96B y C (Grupo Violeta-Azul) en la carta de colores de la RHS. Los resultados mostraron que el color de los pétalos cambió a azul debido a la desoxiviolaceína.

Los valores analíticos y colorimétricos de plantas transgénicas de rosa representativas se presentan en la tabla siguiente.

[Tabla 1]

código	Valor colorimétrico			Antocianidina	Flavonol		Violaceínas		
	Tono (°)	Ref% (%)	λ Min (nm)	Cya (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)	VC (mg/g)	Dvc (mg/g)	DvcG (mg/g)
OS cont.	351,79	38,87	540	0,032	2,666	0,173	0	0	0
OS/7673-53-04	295.55	12.88	570	0.004	3.060	1.482	0	0.102	0.004
OS/7674-13-05	314.61	27.67	570	0.007	3.054	0.821	0	0.002	0.008
OS/7674-65-02	283.30	18.21	580	0.004	2.469	1.208	0	0.019	0
OS/7674-65-03	286.72	26.90	570	0.004	2.083	1.011	0	0.017	0.002

OS/7674- 71-02	318.26	24.21	570	0.004	2.059	1.323	0	0.19	0.004
-------------------	--------	-------	-----	-------	-------	-------	---	------	-------

Tono: ángulo de tono, Ref%: reflectancia, λ Min: valor mínimo del espectro de reflexión, Cya: cianidina, Q: quercetina, K: kaempferol, VC: violaceína, Dvc: desoxi-violaceína, DvcG: glucósido de desoxi-violaceína