

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 517**

51 Int. Cl.:

**A01H 5/02** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2011 E 11160693 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.07.2021 EP 2374349**

54 Título: **Plantas de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* que presentan un fenotipo de flor modificado**

30 Prioridad:

**31.03.2010 US 750965**  
**31.03.2010 EP 10158786**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.02.2022**

73 Titular/es:

**KLEMM & SOHN GMBH & CO. KG (100.0%)**  
**Hanfäcker 10**  
**70378 Stuttgart, DE**

72 Inventor/es:

**DOHM, ANDREA;**  
**SANDER, ULRICH y**  
**KLEMM, NILS**

74 Agente/Representante:

**ANGOLOTI BENAVIDES, Joaquín**

**ES 2 895 517 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Plantas de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* que presentan un fenotipo de flor modificado

5 La presente invención se refiere a una forma de flor modificada en plantas pertenecientes a los géneros *Osteospermum* y *Dimorphoteca*, que es inducida por un alelo mutante, así como al procedimiento de reproducción de plantas de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* que presentan tal forma de flor modificada.

10 El género *Osteospermum* se introdujo como planta de parterre comercial a principios de los años noventa del siglo pasado. Desde entonces, este género ha tenido mucho éxito en el mercado hortícola. Para 2008, las ventas mundiales se estimaron en casi 100 millones de plantas.

15 El género *Osteospermum* es originario de Sudáfrica y pertenece a la familia de plantas de las *Asteraceae*. Comprende casi 70 especies diferentes que representan una amplia gama de arbustos de hoja perenne o plantas herbáceas con hábitos de crecimiento que varían de erectos a postrados. Se cree que los cultivares de *Osteospermum* existentes son híbridos interespecíficos de las siguientes especies principales: *O. ecklonis*, *O. barbariae*, *O. caulescens*, *O. fruticosum*, *O. jucundum* y *O. chrysanthemifolia*. La primera cría con *Osteospermum* fue iniciada entre 1970 y 1985 por criadores aficionados británicos y posteriormente continuada principalmente por  
20 obtentores daneses y japoneses (Allavena, A., y col., *Genetic engineering of Osteospermum ssp.: a case story, Acta Hort.*, 508, 129-133 (2000)). Según Faccioli, y col., los obtentores profesionales utilizaron el material vegetal británico, así como las accesiones de Sudáfrica, para obtener nuevos híbridos (Faccioli, P., y col., *Genetic diversity in cultivated Osteospermum as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis, Plant Breed.*, 119, 351-355 (2000)). Durante el mejoramiento posterior, realizado principalmente por empresas profesionales de reproducción danesas y alemanas, se realizaron cruces entre las plantas existentes para mejorar la calidad. Este enfoque ha dado  
25 como resultado un estrecho acervo genético el material vegetal, que está disponible comercialmente en la actualidad. Los géneros *Osteospermum* y *Dimorphoteca* están estrechamente relacionados y, en algunos casos, incluso la distinción de ambos géneros o la clasificación de ciertas variedades en estos dos géneros no está clara. En el pasado, el género *Osteospermum* pertenecía al género *Dimorphoteca*, pero hoy en día *Dimorphoteca* solo comprende las especies anuales, mientras que todas las especies semiperennes pertenecen al género  
30 *Osteospermum*. Es posible el cruce entre ambos géneros y distintas variedades comerciales son el resultado de la hibridación intergenérica entre un *Osteospermum* y un progenitor *Dimorphoteca*. Los diferentes cultivares de *Osteospermum* y *Dimorphoteca*, las líneas de reproducción y las especies silvestres representan una amplia gama de diferentes niveles de ploidía que van desde 2x hasta casi 8x, lo que también demuestra que durante el desarrollo de los cultivares actuales se produjo la hibridación entre especies. Para la producción comercial, las plantas de  
35 *Osteospermum* y *Dimorphoteca* se propagan principalmente de forma asexual por esquejes. Sin embargo, también es posible la propagación sexual a través de semillas y existen en el mercado varias variedades propagadas por semillas.

40 Las plantas de *Osteospermum* disponibles comercialmente florecen desde principios de la primavera hasta el otoño. La flor típica es un capítulo (cabeza de la flor) con flósculos discales centrales tubulares rodeados por un anillo de flósculos radiales, lo que confiere a las flores la típica forma de margarita (Faccioli, P., y col., *Genetic diversity in cultivated Osteospermum as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis, Plant Breed.*, 119: 351-355 (2000)). El color y la forma de los flósculos radiales, así como el color de los flósculos discales, varían. El color de la superficie superior de los flósculos radiales, que en lenguaje coloquial se denominan pétalos, está determinado por  
45 dos vías metabólicas independientes que producen carotenoides, visibles como colores amarillo-anaranjado-marrón, y antocianinas, que dan como resultado colores de flores de blanco a rosa y violeta. (Seitz, C., *Klonierung und Charakterisierung von Flavonoidgenen aus Osteospermum, Dissertation an der Technischen Universität München* (2004)). Los intensos trabajos de cría durante los últimos años han dado como resultado una amplia gama de colores de pétalos blancos, rosados, violetas, amarillos y naranjas y a nuevas mezclas de los grupos de colores de carotenoides y antocianinas, así como a patrones de color como tipos de ojos o rayas. Al igual que la gama de colores de la superficie superior, el color de la superficie inferior de los flósculos radiales también varía de colores claros a oscuros en la gama de colores rosa azulado o amarillo-marrón. El patrón de color suele ser rayado con las rayas de colores que van paralelas a los bordes de los pétalos. Por lo general, el color de las flores del disco es más oscuro que el color de las flores del radio y puede variar de gris a azul, violeta o púrpura o de amarillo oscuro a  
55 marrón oscuro. La forma habitual del florete radial es obovada, pero en algunos genotipos los bordes de los pétalos se enrollan hacia arriba, dando lugar a los llamados tipos cuchara o araña.

60 En 2002 se estableció un programa de reproducción de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* para producir plantas de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* de floración modificada. Las plantas de *Osteospermum* con inflorescencias inusuales son deseables, ya que se cree que las flores modificadas, que muestran principalmente flósculos discales agrandados, permanecen abiertas incluso en completa oscuridad, mientras que las flores normales se cierran ya en condiciones de poca luz (menos de 2000 Lux).

65 Además, para las plantas de floración modificada, la capacidad de conservación de las flores es más prolongada tanto en el campo como en el invernadero, en comparación con las flores de una planta de floración normal. Se cree que esta mayor capacidad de conservación de las flores es el resultado de una menor producción de semillas debido

a la disponibilidad limitada de polen en las plantas de floración modificada. Esta disponibilidad limitada de polen es una consecuencia directa de los flósculos discales agrandados que impiden que los insectos polinizadores alcancen al polen.

- 5 Por último, aunque la mayoría de las variedades o surtidos de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* disponibles comercialmente se propagan vegetativamente por esquejes, distintas variedades o surtidos de los géneros *Osteospermum* y *Dimorphoteca* tales como "Asti" y "Passion Mix" se propagan por semillas. Para la producción de híbridos F<sub>1</sub> de las variedades propagadas por semillas, las flores del progenitor femenino del cruce generalmente deben emascularse para evitar la autopolinización y luego se polinizan con polen de un progenitor masculino  
10 seleccionado para producir semillas híbridas. Para evitar los costosos y laboriosos procedimientos de emasculación y polinización manual, sería muy deseable un sistema que inhiba la autopolinización en las plantas bisexuales de *Osteospermum* y *Dimorphoteca*. En algunas especies de plantas, pueden utilizarse en este sentido sistemas biológicos tales como la esterilidad masculina o la autoincompatibilidad, pero estos sistemas no están descritos para *Osteospermum* o *Dimorphoteca*. Sin embargo, en el caso de las plantas de *Osteospermum* y *Dimorphoteca*, que  
15 presentan el tipo de flor modificada con flósculos discales agrandados, las anteras están cubiertas por los flósculos discales agrandados y, por lo tanto, el polen no se encuentra disponible libremente para los insectos polinizadores. Por lo tanto, las semillas híbridas de estas plantas pueden obtenerse sin emasculación por polinización de insectos, lo que reduce significativamente los costes de producción de semillas híbridas F<sub>1</sub>.
- 20 Por los motivos anteriores, es deseable desarrollar plantas de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* de floración modificada que presenten flósculos discales agrandados.

Se intentaron varios enfoques tales como el tratamiento de mutaciones y cruces interespecíficos e intergenéricos para lograr un rasgo de floración modificado en los géneros *Osteospermum* y *Dimorphoteca*.

- 25 Se realizaron varios experimentos sobre la inducción de mutaciones por irradiación Gamma de material vegetal de *Osteospermum* y *Dimorphoteca*. Ejemplos de referencias que ilustran la alteración del tipo de flor a través de la mutación son el tipo de flor modificada en la batata ornamental (Bhate, R.H., *Chemically Induced Floral Morphological Mutations in Two Cultivars of Ipomoea purpurea* (L.) Roth, *Scientia Horticulturae*. 88: 133-145 (2001));  
30 en *Chrysanthemum* (Rana, R.S., *Radiation-Induced Variation in Ray-Floret Characteristics of Annual Chrysanthemum*, *Euphytica*. 8: 270-322 (1965)); en rosas (Teruo, N., Ikegami, Y., Matsuda, Y. y Toyoda, H., *Induction of Morphologically Changed Petals from Mutagen-Treated Apical Buds of Rose and Plant Regeneration from Varied Petal-Derived Calli*, *Plant Biotechnology*, 8: 233-236 (2001)); y en plantas en general (Krasaechai, A.L.D., y col., *Low-Energy Ion Beam Modification of Horticultural Plants for Induction of Mutation, Surface and Coatings Technology*, 203: 2525-2530 (2009)). A este respecto es importante mencionar que el nivel de ploidía de casi todos los cultivares de *Osteospermum* es tetraploide, mientras que el nivel de ploidía de los cultivares de *Dimorphoteca* varía de 2x a 6x. Esto significa que, en el caso de una mutación recesiva, serían necesarias al menos dos generaciones para que el fenotipo de cualquier mutación recesiva se hiciera visible. En el caso de una mutación dominante, el fenotipo se haría visible en la generación M<sub>0</sub>.

- 40 El solicitante realizó una primera serie de experimentos con semillas maduras que habían sido recolectadas de diferentes cultivares de *Dimorphoteca*. Se trataron lotes de 30 semillas cada uno con dosis de irradiaciones Gamma que variaban de 15 a 40 Gy durante periodos que variaban de 5 a 30 minutos. Inmediatamente después de este tratamiento, las semillas se empaparon en una solución de polietilenglicol (PEG) al 10 % durante 4 horas, la solución se lavó y las semillas se sembraron en un sustrato de plántula estándar. La germinación comenzó después de  
45 aproximadamente una semana. Tres semanas después de la siembra, cuando se desarrolló el primer par de hojas, se trasplantaron las plántulas. Tres semanas después del trasplante, las plántulas se plantaron en macetas de 11 cm de diámetro y se cultivaron según protocolos estándar. La primera floración comenzó unas 10 semanas después del traslado a la maceta. Las poblaciones de plantas se evaluaron continuamente para detectar los efectos o mutantes causados por la irradiación Gamma. Dependiendo de la dosis y el periodo de irradiación, germinaron menos semillas y aparecieron más plántulas malformadas, que no siguieron desarrollándose. Las alteraciones del hábito de crecimiento, así como los tipos de follaje modificados, fueron difíciles de evaluar, porque las semillas procedían de cruces y, por lo tanto, se esperaba la segregación de estos caracteres en la descendencia. Sin embargo, aparecieron colores de flores modificados, que fueron resultado de la mutación y no de la segregación de  
50 los colores de las flores progenitoras. Estos nuevos colores mostraron que las mutaciones generales de las características de las flores habían sido inducidas con éxito por la irradiación Gamma. Sin embargo, no se detectaron formas de flores modificadas en estas poblaciones de plantas.

- 60 El solicitante realizó una segunda serie de experimentos con esquejes enraizados de diferentes cultivares de *Dimorphoteca*. Los esquejes se enraizaron en macetas de papel estándar en un periodo de 4 semanas. Una vez enraizados con éxito, los esquejes se recortaron por encima del quinto par de hojas e inmediatamente se irradiaron con rayos Gamma. Las dosis y los periodos de irradiación correspondieron a los experimentos anteriores con semillas. Después de la irradiación, los esquejes se plantaron en macetas de 11 cm de diámetro que contenían un sustrato de crecimiento estándar y se cultivaron en condiciones de crecimiento estándar. Las plantas jóvenes se podaron dos veces durante un periodo de 6 semanas para permitir que las células mutadas se desarrollaran en brotes. La floración comenzó aproximadamente 13 semanas después de la siembra. Las plantas se evaluaron  
65

continuamente en busca de mutantes. Se detectaron varios hábitos de crecimiento, formas de follaje y colores de flores modificados. Sin embargo, no aparecieron formas de flores modificadas en ninguna de las plantas irradiadas.

Cruces interespecíficos e intergenéricos

5 Se recolectaron representantes de diferentes especies de los géneros *Osteospermum* y *Dimorphoteca* y se realizaron experimentos de cruzamiento con cultivares comerciales de *Osteospermum*. En todas las combinaciones, uno de los progenitores era una variedad comercial.

10 De manera ocasional, en la progenie de plántulas de *Osteospermum* se detectaron plantas individuales que presentaban un verticilo adicional de flósculos radiales. Estos flósculos, que estaban ubicados en la base de los flósculos radiales principales, eran significativamente más estrechos que los flósculos radiales principales y estaban orientados verticalmente al primer verticilo. Estas flores todavía producían órganos femeninos en la base de los flósculos radiales y eran hembras fértiles, lo que se demostraba por la producción de semillas. Este verticilo  
15 adicional de flósculos radiales no era estable y mostraba una interacción significativa entre el genotipo y el medio ambiente. Las respectivas plantas se autopolinizaron y se cruzaron para estabilizar este fenotipo. Sin embargo, el rasgo no se detectó en ninguna de las progenies y, por lo tanto, es evidente que no era genéticamente estable. En resumen, solo se logró la producción de semillas interespecíficas o intergenéricas para dos combinaciones, lo que se puso de manifiesto por un fenotipo intermedio de la descendencia. Entre esta descendencia, así como en  
20 generaciones posteriores producidas a partir de estas plantas, no se detectaron plantas de floración modificada estables.

Por tanto, todavía existe la necesidad de plantas de floración modificada estables que presenten flósculos de disco  
25 agrandados. En consecuencia, la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación describe un fenotipo de flor modificado en *Osteospermum* y *Dimorphoteca* expresado en la  
formación de flósculos de disco agrandados o convertidos. Este tipo de flor modificado es inducido por un alelo  
mutante llamado alelo KLEDF.

30 La divulgación describe, de manera adicional, nuevas plantas de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* caracterizadas por sus flores únicas que pueden producirse mediante los procedimientos descritos.

Además, se describen el polen, la semilla y la progenie sexual, así como asexual, de tales plantas con flores  
35 modificadas.

Además, se describen procedimientos de propagación de dichas plantas y usos de las mismas.

Además, se describe un procedimiento de producción de una planta de *Osteospermum* que presenta un fenotipo de  
40 flor modificado, en el que el procedimiento comprende cruzar una planta de *Osteospermum* de la presente invención con una planta de *Osteospermum* diferente que no presenta un fenotipo de flor modificado.

Además, se describe un procedimiento de producción de una planta de *Dimorphoteca* que presenta un fenotipo de  
45 flor modificado, en el que el procedimiento comprende cruzar la planta de *Dimorphoteca* de la presente invención con una planta de *Dimorphoteca* diferente que no presenta un fenotipo de flor modificado.

También se describe un procedimiento de producción de una planta híbrida intergenérica que presenta un fenotipo  
de flor modificado, en el que el procedimiento comprende cruzar la planta de *Osteospermum* de la presente  
invención con la planta de *Dimorphoteca* de la presente invención.

50 También se describe un procedimiento de producción de una planta híbrida intergenérica que presenta un fenotipo de flor modificado, en el que el procedimiento comprende cruzar la planta de *Osteospermum* de la presente invención con una planta de *Dimorphoteca* que no presenta un fenotipo de flor modificado.

De manera adicional, se describe un procedimiento de producción de una planta híbrida intergenérica que presenta  
55 un fenotipo de flor modificado, en el que el procedimiento comprende cruzar la planta de *Dimorphoteca* de la presente invención con una planta de *Osteospermum* que no presenta un fenotipo de flor modificado.

Se describe un procedimiento de producción de una semilla de *Osteospermum* que comprende cruzar una primera  
60 planta de *Osteospermum* progenitora con una segunda planta de *Osteospermum* progenitora y cosechar la semilla resultante, en el que dicha primera y/o segunda planta de *Osteospermum* progenitora es la planta de *Osteospermum* de la presente invención.

Se describe un procedimiento de producción de una semilla intergenérica, en el que el procedimiento comprende  
65 cruzar la planta de *Osteospermum* de la presente invención con una planta de *Dimorphoteca* y cosechar la semilla intergenérica resultante.

Se describe, además, un procedimiento de producción de semillas intergenéricas, en el que el procedimiento comprende cruzar la planta de *Osteospermum* de la presente invención con una planta de *Dimorphoteca* que no presenta un fenotipo de flor modificado y cosechar la semilla intergenérica resultante.

- 5 Se describe, además, un procedimiento de producción de semillas intergenéricas, en el que el procedimiento comprende cruzar la planta de *Dimorphoteca* de la presente invención con una planta de *Osteospermum* que no presenta un fenotipo de flor modificado y cosechar la semilla intergenérica resultante.

10 También se describe el uso de los cebadores según las SEQ ID Nos. 1 y 2 para identificar plantas con un fenotipo de floración modificado. Preferiblemente, las plantas son plantas de la familia *Asteraceae*. Más preferiblemente, las plantas son plantas de *Osteospermum* o *Dimorphoteca*. Preferiblemente, los cebadores se utilizan en un análisis de AFLP. Preferiblemente, se obtiene un fragmento de aproximadamente 151 pb utilizando estos cebadores.

15 También se describe el uso de los cebadores según las SEQ ID Nos. 3 y 4 para identificar plantas con un fenotipo de floración modificado. Preferiblemente, las plantas son plantas de la familia *Asteraceae*. Más preferiblemente, las plantas son plantas de *Osteospermum* o *Dimorphoteca*. Preferiblemente, los cebadores se utilizan en un análisis de SNP.

20 En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína con homología con la proteína similar a CYCLOIDEA de *Senecio vulgaris* y que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID No. 5 u 11. En una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico tiene una C en una posición correspondiente a la posición 73 de SEQ ID No. 5. Además, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que consta de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID No. 5 u 11. En una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico tiene una C en una posición correspondiente a la posición 73 de SEQ ID No. 5. La presente invención también se refiere a una proteína aislada codificada por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas definidas anteriormente y a plantas transgénicas que han sido transformadas con cualquier de las moléculas de ácido nucleico definidas anteriormente y que presentan un fenotipo de flor modificado. Preferiblemente, las plantas transgénicas son de la familia de las *Asteraceae*.

30 Por último, se describe un procedimiento de transferencia del alelo mutante KLEDF de una planta de *Osteospermum* a otra planta de *Osteospermum* o *Dimorphoteca*, que comprende cruzar la planta de *Osteospermum* de la presente invención con otra planta de *Osteospermum* o *Dimorphoteca*, recolectar semillas F<sub>1</sub> de dicho cruce, autofecundar o cruzar las plantas F<sub>1</sub> derivadas de dichas semillas F<sub>1</sub> durante una o más generaciones y examinar las plantas derivadas de dicha autofecundación o dicho cruce para detectar la presencia de dicho alelo mutante KLEDF.

35

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un primer plano de una planta de *Osteospermum* de floración normal.

40 La Figura 2 muestra un primer plano de una planta de *Osteospermum* de floración modificada con flósculos de disco tubulares agrandados que encierran el gineceo y el androceo.

La Figura 3 muestra un primer plano de una planta de *Osteospermum* de floración modificada con flósculos de disco abiertos agrandados transformados en flores liguladas.

La Figura 4 muestra un dibujo de una sección transversal longitudinal de la inflorescencia de una planta de *Osteospermum* de floración normal.

45 La Figura 5 muestra un dibujo de una sección transversal longitudinal de la inflorescencia de una planta de *Osteospermum* de floración modificada con flósculos de disco tubulares. El primer plano muestra que el flósculo de disco tubular agrandado encierra el gineceo y el androceo.

La Figura 6 muestra un dibujo de una sección transversal longitudinal de la inflorescencia de una planta de *Osteospermum* de floración modificada con flósculos de disco abiertos transformados en flores liguladas.

50 La Figura 7 muestra una planta entera con flores de genotipo OE 2008 248.

La Figura 8 muestra una planta entera con flores de genotipo OE 2008 258.

La Figura 9 muestra una planta entera con flores de genotipo OE 2008 274.

La Figura 10 muestra una planta entera con flores de genotipo OE 2008285.

La Figura 11 muestra una planta entera con flores de genotipo OE 2008384.

55 La Figura 12 muestra una planta entera con flores de genotipo OE 2008 390.

La Figura 13 muestra la determinación de la longitud del flósculo discal en una planta de *Osteospermum* de floración normal (a), en una planta de *Osteospermum* de floración modificada con flósculos de disco tubulares agrandados (b) y una planta de *Osteospermum* de floración modificada con flores liguladas (c).

60 La Figura 14 muestra, en la parte superior, una planta de *Osteospermum* de floración normal (1), una planta de *Osteospermum* de floración modificada con flósculos de disco tubulares agrandados (2) y una planta de *Osteospermum* de floración modificada con flores liguladas (3) y, en la parte inferior, la determinación de la longitud de la corola del flósculo discal en estas plantas (4).

La Figura 15 muestra el análisis AFLP de plantas de *Osteospermum* de floración normal (carriles 1-4) y plantas de *Osteospermum* de floración modificada (carriles 5-10). La banda marcadora de 151 pb que solo está presente en las plantas con flores modificadas de la presente invención está marcada con una flecha.

65

## DEFINICIONES

5 En la descripción y las tablas que siguen, se utilizan varios términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluyendo el alcance que se les dará a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

10 Adaptador. Las moléculas adaptadoras para la técnica AFLP son moléculas cortas de ácido nucleico de las cuales una parte es complementaria al extremo pegajoso del fragmento de restricción y una parte es una doble hebra de secuencia conocida, que normalmente comprende de 10 a 15 pb. Moléculas adaptadoras a modo de ejemplo se muestran en las SEQ ID Nos. 6 a 9.

15 Alelo. Un alelo es cualquiera de una o más formas alternativas de un gen que se relacionan con un rasgo o característica. En una célula u organismo diploide, los dos alelos de un gen determinado ocupan *loci* correspondientes en un par de cromosomas homólogos.

20 Flor modificada. Tal como se utiliza en el presente documento, flor, flores, floración, flósculo y flósculos "modificada/o(s)", "convertida/o(s)" y "agrandada/o(s)" se usan indistintamente y se refieren a plantas de *Osteospermum* o *Dimorphoteca* que producen inflorescencias con flósculos de disco significativamente agrandados. Estos flósculos de disco agrandados tienen una longitud de al menos 0,8 cm, mientras que la longitud de los flósculos discales en las plantas con flores normales o típicas suele ser inferior a 0,8 cm. Preferiblemente, los flósculos discales agrandados tienen una longitud de al menos 1,3 cm. Los flósculos discales agrandados pueden seguir siendo tubulares y encerrar el gineceo y androceo (Figura 2 y Figura 5) o los flósculos discales agrandados pueden extenderse más y abrirse y pueden transformarse en flores liguladas (Figura 3 y Figura 6), dando lugar a un fenotipo de floración doble. Todas las transiciones de estas los fenotipos pueden ocurrir en las plantas de la presente invención.

30 AFLP. El polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) es un procedimiento muy sensible para detectar polimorfismos en el ADN. Tras la digestión del ADN con enzimas de restricción, se selecciona un subconjunto de fragmentos de ADN para la amplificación por PCR y su visualización en un gel de poliacrilamida desnaturizante. El análisis de AFLP se describe en detalle en Vos y col. (1995) *Nucleic Acids Res* 23: 4407-14. Mediante el análisis de AFLP de las plantas de la presente invención en comparación con las plantas de floración normal, se identificó un marcador que puede usarse para discriminar entre plantas de floración normal y modificada. Este marcador es un fragmento de aproximadamente 151 nucleótidos que se obtiene digiriendo el ADN genómico de las plantas con las enzimas de restricción EcoRI y MseI, ligando los adaptadores según las SEQ ID Nos. 6 a 9 y amplificando el ADN de las plantas de floración modificada con los cebadores, de acuerdo con las SEQ ID Nos. 1 y 2. El fragmento de 151 pb solo está presente en las plantas con floración modificada, pero no en las plantas con floración normal.

40 Androceo. Partes masculinas de la flor (= conjunto de estambres).

45 Propagación asexual/reproducción asexual. Propagación o reproducción asexual significa todo tipo de propagación de una planta, aparte de las semillas, por ejemplo, por esquejes, injertos, división o regeneración en cultivo de tejidos.

50 Longitud media. La longitud media de, por ejemplo, los flósculos de disco en una inflorescencia de *Osteospermum* se determinan midiendo la longitud del flósculo discal más pequeña y más larga y calculando su media, que luego se toma como la longitud media del flósculo discal de esa inflorescencia respectiva.

50 Retrocruzamiento. El retrocruzamiento es un procedimiento en el que un obtentor cruza repetidamente la progenie híbrida con uno de los progenitores, por ejemplo, un híbrido F<sub>1</sub> de primera generación con uno de los genotipos progenitores del híbrido F<sub>1</sub>.

55 Análisis segregante masivo. Se trata de una estrategia de mapeo rápido adecuada para rasgos cualitativos monogénicos. Cuando el ADN de diez plantas se agrupa en un acervo, todos los alelos deben estar presentes. Dos grupos de segregantes agrupados que difieren en un rasgo solo se diferenciarán en el *locus* que alberga ese rasgo.

60 Capítulo. El capítulo se refiere a una inflorescencia en forma de un disco central de flores sésiles llamadas flósculos discales y un anillo exterior de estructuras similares a pétalos llamadas flósculos radiales. Los flósculos discales son generalmente perfectos mientras que los flósculos radiales son generalmente imperfectos.

65 Célula. Tal como se utiliza en el presente documento, célula incluye una célula vegetal, ya sea aislada, en cultivo de tejidos o incorporada a una planta o parte de una planta.

Quimera. Una quimera o una planta quimérica es una planta que consta de dos o más grupos de células genéticamente distintos. La distinción genética generalmente se origina a partir de una mutación.

5 Corola. Término colectivo que designa todos los pétalos de una sola flor. La única flor en este caso puede ser un flósculo discal o un flósculo radial.

10 Proteína similar a CYCLOIDEA de *Senecio vulgaris*. Se ha identificado un polimorfismo de un solo nucleótido en una secuencia de ácido nucleico que muestra homología con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína similar a CYCLOIDEA de *Senecio vulgaris*. La secuencia de aminoácidos de la proteína similar a CYCLOIDEA de *Senecio vulgaris* y la secuencia de ácido nucleico que la codifica se encuentran depositadas con el número de acceso FJ356703 en la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

15 Daminozida. Es un regulador del crecimiento de las plantas que presenta la estructura química del ácido N-(dimetilamino)succinámico que se comercializa con el nombre Daminozida, Alar, Kylar o B9.

Planta *Dimorphoteca*. Se refiere a una planta del género *Dimorphoteca*, por ejemplo, *Dimorphoteca sinuata* o *Dimorphoteca pluvialis*.

20 Flósculo discal. Una de las pequeñas flores tubulares actinomorfas que constituyen la parte central de la cabeza de la flor en las plantas *Compositae* o *Asteraceae*. Los flósculos discales agrandados de la presente invención pueden seguir siendo tubulares o transformarse en flores liguladas.

25 Herencia dominante. Se refiere a un modo de herencia en el que el fenotipo de una determinada característica o rasgo está determinado por un alelo dominante.

Alelo dominante. El fenotipo de un alelo dominante es visible en un genotipo heterocigoto.

30 Flor doble. En la familia de las plantas *Asteraceae* o *Compositae*, la expresión "flor doble" o "flor semidoble" se refiere a inflorescencias que presentan más de un verticilo de flósculos radiales. En las plantas totalmente de "doble floración", todos los flósculos discales se transfieren a los flósculos radiales, mientras que en las plantas de "semidoble floración", solo varios verticilos de los flósculos discales se transforman en flósculos radiales.

Embrión. El embrión es la pequeña planta juvenil contenida dentro de una semilla madura.

35 Rescate de embriones. Se refiere a una técnica destinada a rescatar embriones inherentemente débiles, inmaduros o híbridos para evitar la degeneración de los embriones que, de otro modo, habrían muerto en una etapa posterior de desarrollo. A continuación, los embriones rescatados se cultivan en un medio adecuado.

40 Flor. Una flor es la estructura reproductiva que se encuentra en las plantas con flores. Las flores individuales se colocan sobre peciolo o pueden estar dispuestas en racimos formando una inflorescencia sobre un tallo.

45 F<sub>2</sub>. El símbolo "F<sub>2</sub>" denota una generación resultante de la autofecundación de la generación F<sub>1</sub> junto con la selección del tipo y la eliminación de los fuera de tipo. El número "F" es un término comúnmente utilizado en genética y designa el número de la generación filial. La generación "F<sub>2</sub>" denota la descendencia que resulta de la autofecundación o del autoacoplamiento de los miembros de la generación que tiene el siguiente número "F" inmediatamente inferior, es decir, la generación F<sub>1</sub>.

50 Gameto. Un gameto es una célula que se fusiona con otro gameto durante la fertilización en organismos que se reproducen sexualmente. En las plantas, los gametos son el óvulo y la célula del polen.

Gen. Tal como se utiliza en el presente documento, "gen" se refiere a un segmento de ácido nucleico. Un gen puede ser introducido en el genoma de una especie, ya sea de una especie diferente o de la misma especie, utilizando transformación o diversos procedimientos de reproducción.

55 Interacción gen-ambiente/interacción genotipo-ambiente. Se refiere al efecto fenotípico de las interacciones entre los genes y el medio ambiente.

60 Transformación genética. Se refiere a la alteración genética de una célula resultante de la captación, incorporación genómica y expresión de material genético extraño.

65 Gen convertido (conversión). Por plantas convertidas genéticamente (conversión) se entiende plantas que se desarrollan mediante una técnica de fitomejoramiento llamada retrocruzamiento en la que se recuperan esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas deseadas de una planta, además de uno o más genes transferidos a la planta mediante la técnica de retrocruzamiento, ingeniería genética o mutación.

Genotipo. Se refiere a la constitución genética de una célula u organismo.

Gineceo. Partes productoras de óvulos de la flor de una planta.

5 Heterocigoto. Se refiere a una constitución genética en la que los alelos correspondientes de un determinado *locus* génico son diferentes.

Homocigoto. Se refiere a una constitución genética en la que los alelos correspondientes de un determinado *locus* génico son idénticos.

10 Depresión endogámica. La depresión por endogamia es la reducción de la aptitud en una población determinada como resultado de la reproducción de parientes cercanos o en plantas que también resultan de la autopolinización.

15 INDEL. Indel describe una clase de mutación especial, es decir, una mutación que da lugar a una inserción y delección colocalizadas y a una ganancia o pérdida neta de nucleótidos.

20 Inflorescencia. Grupo o racimo de flores dispuestas en un tallo que se compone de una rama principal o una disposición de ramas. En un *Osteospermum* de floración normal, la inflorescencia está formada por flósculos discales rodeados por flósculos radiales.

Cruce intergenérico. Por cruce intergenérico se entiende la hibridación sexual de dos individuos, cada uno de un género diferente, tales como *Osteospermum* y *Dimorphoteca*.

25 Híbrido intergenérico. Por híbrido intergenérico se entiende una planta de la generación F<sub>1</sub> resultante de un cruce intergenérico o de un cruce entre dos géneros diferentes.

Cruce interespecífico. Por cruce interespecífico se entiende la hibridación sexual de dos individuos, cada uno de ellos de especies diferentes.

30 Híbrido interespecífico. Por híbrido interespecífico se entiende una planta de la generación F<sub>1</sub> resultante de un cruce interespecífico o de un cruce entre dos especies diferentes.

35 Capacidad de conservación. La capacidad de conservación se refiere al periodo entre la apertura completa de las flores, es decir, cuando los botones florales comienzan a mostrar el color de los pétalos y el marchitamiento de las flores, es decir, cuando dos o tres pétalos comienzan a mostrar síntomas de envejecimiento y la flor comienza a parecer apagada. Por otra parte, la apertura completa de las flores es el momento en el que se despliegan los flósculos radiales y la pérdida completa de las flores se caracteriza por el plegamiento de los flósculos radiales y la flexión concomitante del tallo de la flor. Para cada genotipo, la diferencia entre el día en que se abrió la flor y el día en que se marchitó se denomina capacidad de conservación de la flor. La capacidad de conservación de las plantas de la presente invención se ha determinado en condiciones de invernadero en Europa Central (por ejemplo, en Stuttgart). En estas condiciones, la capacidad de conservación media de las plantas de flores normales fue de aproximadamente 12 días, mientras que la capacidad de conservación media de las plantas de la presente invención fue de al menos 15 días, preferiblemente de 16 o 17 días. De manera alternativa, la capacidad de conservación de las plantas de la presente invención se ha determinado en el campo, en verano, en Europa Central (por ejemplo, en Stuttgart), es decir, en condiciones de días largos con condiciones ambientales cambiantes. Las plantas de flores modificadas de la presente invención se cultivaron aisladas de las plantas de flores normales para evitar la polinización de las plantas de flores modificadas por las plantas de flores normales. En estas condiciones, la capacidad de conservación de las plantas de flores normales fue de menos de diez días, por ejemplo, ocho o nueve días y la capacidad de conservación de las plantas de la presente invención fue de al menos 15 días, preferiblemente 16 o 17 días, más preferiblemente 18 o 19 días y más preferiblemente 20 días.

55 Alelo KLEDF. Se trata del alelo responsable del desarrollo del fenotipo de flor modificado de la presente invención, es decir, un fenotipo en el que al menos una inflorescencia tiene al menos un flósculo discal con una longitud de al menos 0,8 cm. Si el alelo KLEDF está presente, la planta mostrará el fenotipo de la presente invención. La presencia del alelo KLEDF puede determinarse mediante la tecnología de marcadores moleculares, por ejemplo, mediante la técnica AFLP. Cuando se aplica esta técnica a las plantas de la presente invención, el ADN genómico de una planta de la presente invención se digiere con EcoRI y MseI, los adaptadores de acuerdo con las SEQ ID Nos. 6 a 9 se ligan a los fragmentos y el ADN se amplifica por PCR utilizando los cebadores según SEQ ID Nos. 1 y 2. Esta amplificación produce un fragmento de aproximadamente 151 nucleótidos que está presente en las plantas con flores modificadas, pero no en las plantas con flores normales.

65 Vínculo/Vínculo genético. Describe la tendencia de ciertos *loci* o alelos genéticos a heredarse juntos. Los *loci* genéticos en el mismo cromosoma están físicamente cerca unos de otros y tienden a permanecer juntos durante la meiosis, por lo que están genéticamente vinculados.

- 5 Locus. Un *locus* confiere uno o más rasgos tales como, por ejemplo, tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades, color de la flor, forma de la flor, altura de la planta, etc. El rasgo puede ser conferido, por ejemplo, por un gen natural introducido en el genoma de la planta por retrocruzamiento, una mutación natural o inducida, o un transgén introducido mediante técnicas de transformación genética. Un *locus* puede comprender uno o más alelos integrados en una única ubicación cromosómica.
- 10 M0. La generación M0 es la generación tratada con un mutágeno.
- 15 Mitosis. Se refiere al procedimiento de división por reducción en el que el número de cromosomas por célula se divide a la mitad y que da lugar a la formación de los gametos. La meiosis es fundamental para la reproducción sexual.
- 20 Marcador molecular/marcador genético. Un marcador molecular o marcador genético es un fragmento de una secuencia de ADN que está asociado a una parte del genoma y unido a un determinado fenotipo tal como el fenotipo de floración modificado de la presente invención. Un marcador molecular descrito en el presente documento es un fragmento de aproximadamente 151 pb que se identificó mediante la técnica AFLP y que solo está presente en las plantas con flores modificadas, pero no en las plantas con flores normales.
- 25 Herencia monogénica. Se refiere a un modo de herencia en el que el fenotipo de una determinada característica o rasgo está determinado por un solo gen.
- 30 Mutación. Las mutaciones son cambios en la secuencia de ADN del genoma de una célula y son causadas por mutágenos como la radiación o sustancias químicas, así como por errores que ocurren durante la replicación del ADN.
- 35 Tratamiento de mutaciones. Se refiere a cualquier tratamiento destinado a introducir mutaciones en la secuencia de ADN del genoma de una célula, en particular el tratamiento con radiación como la irradiación Gamma y el tratamiento con mutágenos químicos como el etilmetanosulfonato (EMS).
- 40 Flor normal. Tal como se utiliza en el presente documento, flor, flores, floración, flósculo y flósculos "normal(es)", "típico/a(s)" y "habitual(es)" se utilizan indistintamente y se refieren a plantas comerciales de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* actualmente disponibles que producen inflorescencias con flósculos discales tubulares que encierran, pero se sitúan por debajo del gineceo y el androceo maduros, teniendo los flósculos discales una longitud media inferior a 0,8 cm (véanse la Figura 1 y la Figura 4).
- 45 Planta de *Osteospermum*. Se refiere a plantas del género *Osteospermum*, por ejemplo, *Osteospermum ecklonis* u *Osteospermum jucundum*.
- 50 PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La PCR describe un procedimiento de biología molecular para amplificar una molécula de ácido nucleico, que comprende esencialmente las etapas de desnaturalización del ADN, hibridación de los cebadores y alargamiento de los cebadores con una ADN polimerasa termoestable, utilizando la secuencia de ácido nucleico que se va a amplificar como matriz.
- 55 Fenotipo. Se refiere a cualquier característica o rasgo observable de un organismo tal como el color de la flor, el tamaño de la planta, etc.
- 60 Planta. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "planta" incluye una referencia a una planta entera inmadura o madura, incluyendo una planta de la que se han eliminado semillas o anteras. La semilla o el embrión que producirá la planta también se considera planta.
- 65 Regulador del crecimiento vegetal. Se refiere a un compuesto natural o sintético que puede regular el crecimiento de las plantas, incluyendo antiauxinas, auxinas, citoquininas, defoliantes, inhibidores de etileno, liberadores de etileno, gametocidas, giberelinas, inhibidores del crecimiento, morfictinas, retardantes del crecimiento y estimuladores del crecimiento. Dentro de la presente invención, se usa preferiblemente un retardante del crecimiento, y más preferiblemente daminozida, para aumentar la producción de semillas en una planta de floración modificada.
- 70 Partes de plantas. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "partes de plantas" (o una planta de *Osteospermum* o *Dimorphoteca*, o una parte de las mismas) incluye, pero no se limita a, protoplastos, hojas, tallos, raíces, ápices de raíces, anteras, pistilos, semillas, embriones, polen, óvulos, cotiledones, hipocótilos, capítulos, pétalos/flósculos radiales, pétalos/flósculos discales, brotes, tejidos, peciolas, células, células meristemáticas y similares.
- 75 Polinización. La polinización es el procedimiento por el cual el polen se transfiere a las plantas, lo que permite la fertilización y la reproducción sexual.

Polimorfismo. En biología vegetal, el polimorfismo ocurre cuando existen dos o más fenotipos claramente diferentes en la misma población de plantas, resultantes de múltiples alelos de un gen dentro de esta población.

5 Cebador. Un cebador es un ácido nucleico monocatenario corto que sirve como punto de partida para la síntesis de ADN, por ejemplo, en la PCR.

10 Progenie. Tal como se utiliza en el presente documento, incluye una planta F<sub>1</sub> de *Osteospermum* o *Dimorphoteca* o una planta híbrida de *Osteospermum* o *Dimorphoteca* producida a partir del cruce de dos plantas de *Osteospermum* o *Dimorphoteca* y su progenie. Incluye, además, pero no se limita a, los cruces generacionales posteriores F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub>, F<sub>9</sub> y F<sub>10</sub> con plantas de la misma generación.

15 Fusión de protoplastos/fusión somática. Se refiere a un procedimiento en plantas por el que se fusionan protoplastos (es decir, células vegetales sin paredes celulares) de dos plantas diferentes para formar una nueva planta híbrida con características de ambas.

20 Loci de rasgos cuantitativos (QTL). Por *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) se entiende los loci genéticos que controlan, hasta cierto punto, los rasgos representables numéricamente que, por lo general, se distribuyen de forma continua.

Flósculo radial. Un flósculo radial o flor ligulada, es uno de los flósculos irregulares externos en las cabezas de las flores de algunas plantas *Compositae* o *Asteraceae*. Coloquialmente, en las plantas *Asteraceae* o *Compositae*, los flósculos radiales se llaman pétalos.

25 Herencia recesiva. Se refiere a un modo de herencia en el que el fenotipo de una determinada característica o rasgo está determinado por un alelo recesivo.

Alelo recesivo. El fenotipo de un alelo recesivo es visible solo en un genotipo homocigoto.

30 Regeneración. La regeneración se refiere al desarrollo de una planta a partir de un cultivo de tejidos.

Progenie segregante. Se refiere a una progenie de plántulas, en la que los rasgos fenotípicos y los genes respectivos se dividen en los individuos singulares de acuerdo con las reglas mendelianas.

35 Selección. Se refiere al procedimiento de elegir entre la progenie de un cruce o las plantas resultantes de la transformación, la fusión de protoplastos o el rescate embrionario de aquellas plantas que presentan el fenotipo y/o genotipo deseado. En el sentido de la presente invención, el fenotipo deseado es el fenotipo de flor modificado tal como se describe en el presente documento y el genotipo deseado se caracteriza por la presencia del alelo KLEDF.

40 Propagación sexual/reproducción sexual. Se refiere a la propagación de plantas a partir de semillas.

45 SNP. Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) es una variación de la secuencia de ADN que se produce cuando un solo nucleótido (A, T, C o G) en el genoma (u otra secuencia compartida) difiere entre miembros de una especie biológica o cromosomas emparejados en un individuo. Se ha descubierto que, en las plantas de floración modificada de la presente invención, la N dentro de la secuencia TTTGANAAAG (SEQ ID No. 10) en un fragmento de ADN amplificado con cebadores de acuerdo con SEQ ID No. 3 y 4 es C, mientras que, en las plantas de floración normal, N es T. En algunas plantas de floración modificada, la sustitución de nucleótidos está en la posición 73 de la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID No. 5.

50 Transformación. Se refiere a un procedimiento en el que un polinucleótido que no está en su contexto natural, por ejemplo, ligado a un promotor con el que no está unido naturalmente, o que está aislado de las otras partes del gen con las que está unido normalmente, se transfiere a una planta. Los procedimientos de transformación adecuados incluyen, pero no se limitan a, transformación mediada por *Agrobacterium*, bombardeo de partículas y electroporación.

### Descripción detallada de la invención

60 Las plantas de floración modificada de la presente invención, de preferencia, presentan sustancialmente todas sus flores modificadas, dando como resultado un fenotipo de flor doble. Sin embargo, en ciertas circunstancias, solo una parte de los flósculos discales puede estar agrandado o solo algunas de las inflorescencias son inflorescencias modificadas. Esto significa que el número de flósculos discales agrandados por inflorescencia puede variar de unos pocos a más de 100 por inflorescencia. No todas las plantas de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* conocidas previamente presentan las flores modificadas de la presente invención. De forma inesperada, el alelo mutante de la presente invención da como resultado inflorescencias con flósculos discales que están significativamente

agrandados en comparación con los flósculos discales de las inflorescencias de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* previamente conocidas.

5 El nuevo fenotipo de floración modificado de la presente invención resultante de un alelo mutante no elimina necesariamente la fertilidad de la flor. Las anteras, que se encuentran en los flósculos discales, pueden ser fértiles y producir polen. Sin embargo, dado que las anteras están cubiertas por los flósculos discales agrandados, el polen no es visible y no está disponible libremente para los insectos y los estigmas están cubiertos por los flósculos discales agrandados y, por lo tanto, no son fácilmente accesibles para los insectos polinizadores. Por lo tanto, en el campo, las plantas con el fenotipo de floración modificado muestran una producción de semillas significativamente reducida  
10 originada por la polinización de insectos y, en consecuencia, una mayor capacidad de conservación de las flores. La producción de semillas generalmente se origina en el gineceo ubicado en la base de los flósculos radiales, mientras que el gineceo del flósculo discal parece estar degenerado tanto en las plantas de floración normal como en las nuevas plantas de floración modificada.

15 Se describen plantas de *Osteospermum* que presentan un fenotipo de flor modificado y al menos un flósculo discal agrandado, preferiblemente al menos dos, cinco, ocho, diez, doce, 15, 18 o 20 flósculos discales agrandados, más preferiblemente al menos 22, 25, 28, 30, 35, 38 o 40 flósculos discales agrandados, incluso más preferiblemente al menos 42, 45, 48, 50, 52, 55, 58 o 60 flósculos discales agrandados, de preferencia, particularmente al menos 62, 65, 68, 70, 72, 73, 75, 78 u 80 flósculos discales agrandados e incluso más preferiblemente 82, 84, 85, 86, 88, 89, 90, 92, 94, 95, 96, 98, 100 o 108 flósculos discales agrandados. Más preferiblemente, todos los flósculos discales de una inflorescencia están agrandados.

Los flósculos discales agrandados tal como se describen en el presente documento tienen una longitud de al menos 0,8 cm, 0,9 cm, 0,96 cm, 1,00 cm, 1,01 cm, 1,15 cm, 1,21 cm, 1,26 cm, 1,29 cm, 1,30 cm, 1,31 cm, 1,34 cm, 1,38  
25 cm, 1,40 cm, 1,42 cm, 1,45 cm, 1,49 cm, 1,51 cm, 1,52 cm, 1,55 cm, 1,57 cm, 1,61 cm, 1,63 cm, 1,64 cm, 1,66 cm, 1,69 cm, 1,70 cm, 1,80 cm, 1,90 cm, 2,0 cm, 2,01 cm, 2,1 cm, 2,16 cm, 2,19 cm, 2,20 cm, 2,23 cm, 2,26 cm, 2,28 cm, 2,30 cm, 2,33 cm, 2,36 cm, 2,37 cm, 2,39 cm, 2,4 cm, 2,5 cm, 2,6 cm, 2,7 cm, 2,8 cm, 2,9 cm, 3,0 cm, 3,1 cm, 3,2 cm, 3,3 cm, 3,4 cm, 3,5 cm, 3,6 cm, 3,7 cm, 3,8 cm, 3,9 cm, 4,0 cm, 4,1 cm, 4,2 cm, 4,3 cm, 4,4 cm, 4,5 cm, 4,6 cm, 4,7 cm, 4,8 cm, 4,9 cm, 5,0 cm, 5,1 cm, 5,2 cm, 5,3 cm, 5,4 cm, 5,5 cm, 5,6 cm, 5,7 cm, 5,8 cm, 5,9 cm y 6,0 cm,  
30 incluyendo todos los números enteros y fracciones de los mismos.

De manera alternativa o adicional, la longitud media de flósculo discal más corta y más larga en al menos una inflorescencia de la planta es de al menos 1,45 cm, 1,49 cm, 1,51 cm, 1,52 cm, 1,55 cm, 1,57 cm, 1,61 cm, 1,63 cm, 1,64 cm, 1,66 cm, 1,69 cm, 1,70 cm, 1,80 cm, 1,90 cm, 2,0 cm, 2,01 cm, 2,1 cm, 2,16 cm, 2,19 cm, 2,20 cm, 2,23 cm, 2,26 cm, 2,28 cm, 2,30 cm, 2,33 cm, 2,36 cm, 2,37 cm, 2,39 cm, 2,4 cm, 2,5 cm, 2,6 cm, 2,7 cm, 2,8 cm, 2,9 cm, 3,0 cm, 3,1 cm, 3,2 cm, 3,3 cm, 3,4 cm, 3,5 cm, 3,6 cm, 3,7 cm, 3,8 cm, 3,9 cm, 4,0 cm, 4,1 cm, 4,2 cm, 4,3 cm, 4,4 cm, 4,5 cm, 4,6 cm, 4,7 cm, 4,8 cm, 4,9 cm, 5,0 cm, 5,1 cm, 5,2 cm, 5,3 cm, 5,4 cm, 5,5 cm, 5,6 cm, 5,7 cm, 5,8 cm, 5,9 cm y 6,0 cm, incluyendo todos los números enteros y fracciones de los mismos.

40 En el presente documento se describe una longitud media de flósculo discal de al menos un flósculo discal de entre 0,8 cm y 6,0 cm, entre 0,8 cm y 5,8 cm, entre 0,8 cm y 5,5 cm, entre 0,8 cm y 5,2 cm, entre 0,8 cm y 5,0 cm, entre 0,8 cm y 4,8 cm, entre 0,8 cm y 4,5 cm, entre 0,8 cm y 4,2 cm, entre 0,8 cm y 4,0 cm, entre 0,8 cm y 3,8 cm, entre 0,8 cm y 3,5 cm, entre 0,8 cm y 3,2 cm, entre 0,8 cm y 3,0 cm, entre 0,8 cm y 2,8 cm, entre 0,8 cm y 2,5 cm, entre 0,8 cm y 2,4 cm, entre 0,8 cm y 2,3 cm, entre 0,8 cm y 2,2 cm, entre 0,8 cm y 2,1 cm, entre 0,8 cm y 2,0 cm, entre  
45 0,8 cm y 1,9 cm, entre 0,8 cm y 1,8 cm, entre 0,8 cm y 1,7 cm, entre 0,8 cm y 1,6 cm, entre 0,8 cm y 1,4 cm, entre 0,8 cm y 1,3 cm o entre 0,8 cm y 1,2 cm.

En el presente documento se describe una longitud media de flósculo discal más corta y más larga de al menos una inflorescencia de entre 0,8 cm y 6,0 cm, entre 0,8 cm y 5,8 cm, entre 0,8 cm y 5,5 cm, entre 0,8 cm y 5,2 cm, entre  
50 0,8 cm y 5,0 cm, entre 0,8 cm y 4,8 cm, entre 0,8 cm y 4,5 cm, entre 0,8 cm y 4,2 cm, entre 0,8 cm y 4,0 cm, entre 0,8 cm y 3,8 cm, entre 0,8 cm y 3,5 cm, entre 0,8 cm y 3,2 cm, entre 0,8 cm y 3,0 cm, entre 0,8 cm y 2,8 cm, entre 0,8 cm y 2,5 cm, entre 0,8 cm y 2,4 cm, entre 0,8 cm y 2,3 cm, entre 0,8 cm y 2,2 cm, entre 0,8 cm y 2,1 cm, entre 0,8 cm y 2,0 cm, entre 0,8 cm y 1,9 cm, entre 0,8 cm y 1,8 cm, entre 0,8 cm y 1,7 cm, entre 0,8 cm y 1,6 cm, entre  
55 0,8 cm y 1,4 cm, entre 0,8 cm y 1,3 cm o entre 0,8 cm y 1,2 cm.

En el presente documento se describe una longitud media de al menos un flósculo discal de entre 1,0 cm y 6,0 cm, entre 1,1 cm y 6,0 cm, entre 1,2 cm y 6,0 cm, entre 1,3 cm y 6,0 cm, entre 1,4 cm y 6,0 cm, entre 1,5 cm y 6,0 cm, entre 1,6 cm y 6,0 cm, entre 1,7 cm y 6,0 cm, entre 1,8 cm y 6,0 cm, entre 1,9 cm y 6,0 cm, entre 2,0 cm y 6,0 cm, entre 2,1 cm y 6,0 cm, entre 2,2 cm y 6,0 cm, entre 2,5 cm y 6,0 cm, entre 2,7 cm y 6,0 cm, entre 3,0 cm y 6,0 cm,  
60 entre 3,2 cm y 6,0 cm, entre 3,5 cm y 6,0 cm, entre 3,8 cm y 6,0 cm, entre 4,0 cm y 6,0 cm, entre 4,2 cm y 6,0 cm, entre 4,5 cm y 6,0 cm, entre 4,8 cm y 6,0 cm, entre 5,0 cm y 6,0 cm, entre 5,2 cm y 6,0 cm, entre 5,5 cm y 6,0 cm o entre 5,8 cm y 6,0 cm.

En el presente documento se describe una longitud media de flósculo discal más larga y más corta de al menos una inflorescencia de entre 1,0 cm y 6,0 cm, entre 1,1 cm y 6,0 cm, entre 1,2 cm y 6,0 cm, entre 1,3 cm y 6,0 cm, entre  
65 1,4 cm y 6,0 cm, entre 1,5 cm y 6,0 cm, entre 1,6 cm y 6,0 cm, entre 1,7 cm y 6,0 cm, entre 1,8 cm y 6,0 cm, entre

1,9 cm y 6,0 cm, entre 2,0 cm y 6,0 cm, entre 2,1 cm y 6,0 cm, entre 2,2 cm y 6,0 cm, entre 2,5 cm y 6,0 cm, entre 2,7 cm y 6,0 cm, entre 3,0 cm y 6,0 cm, entre 3,2 cm y 6,0 cm, entre 3,5 cm y 6,0 cm, entre 3,8 cm y 6,0 cm, entre 4,0 cm y 6,0 cm, entre 4,2 cm y 6,0 cm, entre 4,5 cm y 6,0 cm, entre 4,8 cm y 6,0 cm, entre 5,0 cm y 6,0 cm, entre 5,2 cm y 6,0 cm, entre 5,5 cm y 6,0 cm o entre 5,8 cm y 6,0 cm.

5 En el presente documento se describe que la longitud media de al menos un flósculo discal está entre 1,0 cm y 3,0 cm, entre 1,0 cm y 2,9 cm, entre 1,0 cm y 2,8 cm, entre 1,0 cm y 2,7 cm, entre 1,0 cm y 2,6 cm, entre 1,0 cm y 2,5 cm, entre 1,0 cm y 2,4 cm, entre 1,0 cm y 2,3 cm o entre 1,0 cm y 2,2 cm.

10 En el presente documento se describe una longitud media de flósculo discal más larga y más corta de al menos una inflorescencia de entre 1,0 cm y 3,0 cm, entre 1,0 cm y 2,9 cm, entre 1,0 cm y 2,8 cm, entre 1,0 cm y 2,7 cm, entre 1,0 cm y 2,6 cm, entre 1,0 cm y 2,5 cm, entre 1,0 cm y 2,4 cm, entre 1,0 cm y 2,3 cm o entre 1,0 cm y 2,2 cm.

15 En el presente documento se describe una longitud media de flósculo discal más corta y más larga de al menos una inflorescencia de entre 1,25 cm y 3,0 cm, entre 1,25 cm y 2,9 cm, entre 1,25 cm y 2,8 cm, entre 1,25 cm y 2,7 cm, entre 1,25 cm y 2,6 cm, entre 1,25 cm y 2,5 cm, entre 1,25 cm y 2,4 cm, entre 1,25 cm y 2,3 cm o entre 1,25 cm y 2,2 cm. En otras realizaciones más de la presente invención, la longitud media de flósculo discal más corta y más larga de al menos una inflorescencia está entre 1,4 cm y 2,4 cm, entre 1,4 cm y 2,2 cm, entre 1,4 cm y 2,0 cm, entre 1,4 cm y 1,9 cm o entre 1,4 cm y 1,8 cm.

20 La presente invención comprende, además, plantas de *Osteospermum* de floración modificada en las que la longitud media de flósculo discal más larga y más corta de al menos una inflorescencia es de 1,45 cm, 1,5 cm, 1,55 cm, 1,6 cm o 1,7 cm.

25 La longitud de los flósculos discales se determina retirando los flósculos discales de la inflorescencia y midiendo la longitud desde la base de los flósculos discales hasta la parte superior (véanse las Figuras 13 y 14). Es posible determinar la longitud de todos los flósculos discales de una inflorescencia, pero en los casos en que la apariencia de los flósculos discales es uniforme, es suficiente determinar la longitud de, por ejemplo, diez flósculos discales y tomar el valor medio de la longitud. De manera alternativa, se determina el valor medio del flósculo discal más pequeño y más largo de una inflorescencia. En realizaciones preferidas, la longitud del flósculo discal se refiere a la longitud de la corola del flósculo discal y, por lo tanto, no incluye la longitud de las anteras que sobresalen de las corolas en las plantas con flores normales.

35 Se describe, además, la relación entre la longitud media de flósculo radial más larga y más corta de al menos una inflorescencia y la longitud media de flósculo discal más larga y más corta de al menos una inflorescencia de menos de 2,0, preferiblemente de menos de 1,95, más preferiblemente de menos de 1,9, y más preferiblemente, de menos de 1,88. En otra realización, la relación entre la longitud media de flósculo radial más larga y más corta de al menos una inflorescencia y la longitud media de flósculo discal más larga y más corta de al menos una inflorescencia está entre 1,2 y 2,0, preferiblemente entre 1,25 y 1,95, más preferiblemente entre 1,3 y 1,9, y más preferiblemente, entre 1,35 y 1,88.

40 También se describe una longitud media de flósculo discal más larga y más corta de una inflorescencia de al menos 1,25 cm y la relación entre la longitud media de flósculo radial más larga y más corta de al menos una inflorescencia y la longitud media de flósculo discal más larga y más corta de al menos una inflorescencia es inferior a 2,0. De manera alternativa, la longitud media de flósculo discal más larga y más corta de una inflorescencia está entre 1,25 cm y 2,0 cm y la relación entre la longitud media de flósculo radial más larga y la más corta de al menos una inflorescencia y la longitud media de flósculo discal más larga y más corta de al menos una inflorescencia está entre 1,2 y 2,0. En una realización adicional, la longitud media de flósculo radial más larga y más corta de al menos una inflorescencia está entre 1,4 cm y 1,8 cm y la relación entre la longitud media de flósculo radial más larga y más corta de al menos una inflorescencia y la longitud media de flósculo discal más larga y más corta de al menos una inflorescencia está entre 1,35 y 1,88. Las plantas de la presente invención también pueden obtenerse mediante un tratamiento de mutación con dosis de irradiación Gamma de hasta 500 Gy, periodos de incubación de hasta varias horas, tratamientos de irradiación repetidos y/o la irradiación del polen o de los botones florales. Además de la irradiación Gamma, también pueden aplicarse rayos X o radiación UV. Además, las plantas pueden tratarse con un mutágeno químico, por ejemplo, con metanosulfonato de etilo (EMS), tal como se describe, por ejemplo, para la inducción de colores y formas florales modificados en *Petunia hybrida* (Gerats T. y Strommer J. (eds.), *Petunia - Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*, Springer Life Sciences, 2ª ed., XXII (2009); Harten van, A.M., *Mutation Breeding: Theory and Practical Applications*, Cambridge University Press (1998)).

60 Las nuevas plantas de *Osteospermum* de floración modificada son genéticamente estables, como lo demuestra la estabilidad del fenotipo de tipo modificado a través de la propagación asexual y la transmisión de este rasgo a la progenie tras los cruces sexuales.

65 La evaluación de la segregación adicional de la progenie combinada con la aplicación de la tecnología de marcadores moleculares ha aclarado la herencia del nuevo fenotipo de flor modificado en *Osteospermum* con más detalle. Para mapear el alelo KLEDF mutante, se produjo una población segregante F<sub>2</sub> o de retrocruzamiento de

plantas que mostraban el fenotipo de flor modificada derivado de un cruce entre una planta de floración normal y una planta de floración modificada. En esta población segregante se realizó un análisis de marcadores moleculares para detectar polimorfismo entre los progenitores y los genotipos de floración normal y los genotipos de floración modificada, respectivamente. El objetivo era identificar marcadores polimórficos en ambos progenitores y diferenciar entre los genotipos de floración normal y los de floración modificada. Para este análisis se utilizaron diferentes técnicas de marcadores moleculares, tales como las técnicas AFLP y SNP. Con estos marcadores de ADN polimórfico se realizó un análisis de ligamiento en la progenie segregante para identificar las ubicaciones cromosómicas del alelo KLEDF.

El análisis AFLP ha demostrado que un fragmento de aproximadamente 151 nucleótidos que se obtiene digiriendo el ADN genómico de las plantas con las enzimas de restricción EcoRI y MseI, ligando los adaptadores según las SEQ ID Nos. 6 a 9 y amplificando el ADN de las plantas de floración modificada con los cebadores de acuerdo con las SEQ ID Nos. 1 y 2 solo puede detectarse en plantas con un fenotipo de floración modificada, pero no en plantas con un fenotipo de floración normal.

Además, el análisis de SNP mostró que la N dentro de la secuencia TTTGANAAAG (SEQ ID No. 10) en un fragmento de ADN amplificado con cebadores de acuerdo con SEQ ID Nos. 3 y 4 es C, mientras que en plantas con flores normales N es T.

El análisis de las plantas con flores modificadas de la presente invención también ha mostrado un rendimiento de semilla reducido en estas plantas. Sin embargo, el rendimiento de semilla podría incrementarse y el fenotipo de las plantas podría transformarse casi al fenotipo de floración normal tratando las plantas de floración modificada con un regulador del crecimiento de las plantas tal como daminozida. Las plantas tratadas de esta manera podrían utilizarse en cruces. Las concentraciones adecuadas del regulador del crecimiento de las plantas, preferiblemente daminozida, son del 0,05 % al 0,4 %, preferiblemente del 0,1 % al 0,3 %, más preferiblemente del 0,15 % al 0,25 % y más preferiblemente del 0,2 %.

#### EJEMPLOS

##### Ejemplo 1 - desarrollo de un fenotipo de flor de *Osteospermum* modificado

En la primavera de 2007, en una población propia de plantas de *Osteospermum*, se encontró una sola planta que mostraba un fenotipo de flor ligeramente modificado. Un análisis más detallado de las flores de esta planta mostró que en algunas de las flores, los flósculos discales se alargaban y cubrían el androceo y el gineceo, mientras que, en las flores normales de la misma planta, el androceo y el gineceo estaban por encima de los flósculos discales. El fenotipo de esta planta fue identificado como una novedad con cierto potencial para resultar útil en el desarrollo de un nuevo tipo de flor dentro del género *Osteospermum*. Por lo tanto, se realizaron más análisis en esta planta.

En primer lugar, había que demostrar si este fenotipo modificado era el resultado de una mutación genética o si se trataba de una modificación inducida por las condiciones ambientales como el verticilo extra de los flósculos radiales descritos anteriormente. Para este propósito, se tomaron repetidamente esquejes de esta planta, se enraizaron y se cultivaron hasta convertirlos en plantas con flores. Entre estas poblaciones de plantas, se detectaron tres grupos diferentes de individuos. El primer grupo de individuos estaba compuesto por plantas que presentaban solo flores normales, mientras que el segundo grupo de plantas presentaba flores con el fenotipo modificado. Otro tercer grupo de plantas consistía en plantas que presentaban ambos tipos de flores, el tipo normal, así como el tipo modificado. Este resultado indicaba que el tipo de flor modificada podría transmitirse por propagación asexual, pero también indicaba que esta planta era una quimera.

A continuación, había que demostrar que el nuevo tipo de flor podría transmitirse a través de la propagación sexual. Por lo tanto, se diseñó un programa de reproducción con esta planta de floración modificada. La transmisión sexual del fenotipo modificado puede depender de los antecedentes genéticos del respectivo progenitor de cruce. Por lo tanto, estos fueron seleccionados cuidadosamente por sus fenotipos y también por sus genotipos, haciendo uso de un análisis de distancia genética que se había realizado en el marco de un proyecto de investigación de Gawenda y Debener divulgado en 2009 (Gawenda, I. y Debener, T., *Genetic diversity of Osteospermum genotypes analysed by AFLP and chloroplast SSR markers, Europ. J. Hort. Sci.*, 74 (2), 86-94 (2009)). Los genotipos de *Osteospermum* de floración normal, que se utilizaron como progenitores de cruce, eran todas variedades de surtido propio o líneas de reproducción.

Se realizó una primera serie de polinizaciones en las que la planta que presentaba el tipo de flor modificada se utilizó como progenitor masculino y femenino. Las flores de los progenitores femeninos cruzadas se emascularon antes de que apareciera el polen maduro. En promedio, 2 días después de la emasculación, los estigmas en la base de los flósculos radiales se extienden, lo que indica que están listas para la polinización. En esta etapa se polinizaron repetidamente con polen del respectivo progenitor masculino. El uso de la planta de floración modificada como progenitor masculino requería habilidades específicas de los polinizadores, ya que el polen tenía que recolectarse con cuidado en la base de los flósculos discales modificados. Aproximadamente 4 semanas después de la

polinización, las semillas estaban listas para la cosecha. En total, se habían realizado 32 combinaciones de cruces, pero solo 16 de las combinaciones produjeron semillas. En total, se cosecharon y sembraron casi 5.000 semillas.

5 Para la siembra, las semillas se empaparon en una solución de PEG al 10 % durante 4 horas, la solución se lavó y las semillas se sembraron en un sustrato de plántula estándar. La germinación comenzó después de aproximadamente una semana. Tres semanas después de la siembra, cuando se desarrolló el primer par de hojas, se trasplantaron las plántulas. Tres semanas después del trasplante, las plántulas se plantaron en macetas de 11 cm de diámetro y se cultivaron de acuerdo con protocolos estándar. La primera floración comenzó unas 10 semanas después del traslado a la maceta.

10 Las poblaciones de plántulas se evaluaron durante un periodo de 4 semanas centrándose principalmente en la selección de plantas que presentaban el tipo de flor modificado. La progenie comprendía un total de 2.459 plantas con flores. En toda la progenie se seleccionaron plantas que mostraban un fenotipo de floración modificado, lo que significa que estas plantas presentaban al menos un flósculo discal alargado. El número de plantas con flores modificadas en comparación con el número total de plántulas varió entre las diferentes progenies. Dado que la primera planta de floración modificada, que se utilizó como progenitor reproductor, fue una quimera, lo que significa que producía flores modificadas además de flores normales en una sola planta, el patrón de segregación era impredecible, aunque solo se habían usado flores modificadas para la polinización. La Tabla 1 resume el número de plantas de floración modificada y de floración normal para 9 progenies, que comprendían suficientes plántulas para un análisis de segregación. De forma inesperada, la frecuencia de plántulas que presentaban flores modificadas estuvo en todas las combinaciones lejos de la correspondiente a una segregación 1:1, la segregación esperada en el caso de una herencia dominante, que se muestra por los respectivos valores de  $\chi^2$  (Tabla 1). También de forma inesperada, ninguno de los descendientes exhibió exclusivamente plantas de floración normal, lo que cabría esperar en el caso de una herencia recesiva. Además, los datos de la Tabla 1 muestran que el rasgo de floración modificado no está relacionado con el color de la flor.

20 En la Tabla 1, la columna 1 muestra el color de los flósculos radiales de las respectivas parejas de cruce que presentan tipos de flores normales. Las columnas 2 a 5 muestran el número de plantas que producen inflorescencias normales para cada color y el número total de plantas. Las columnas 6 a 9 muestran el número de plantas que producen inflorescencias modificadas para cada color y el número total de plantas con inflorescencias modificadas. Las columnas 10 a 13 muestran el número total de plantas para cada color, así como el número total de plántulas evaluadas por progenie. Por último, la columna 14 muestra los valores de  $\chi^2$  al cuadrado para cada fila que corresponden a una segregación 1:1 del fenotipo de flor modificada al fenotipo de flor normal.

35 Después de la propagación sexual por cruzamiento en diferentes cultivares y líneas de reproducción de *Osteospermum*, se encontraron plántulas de floración modificada estable entre la progenie  $F_1$ . La transmisión exitosa del rasgo floral modificado a la progenie sexual muestra que este rasgo es genéticamente estable. Sin embargo, el patrón de segregación del rasgo floral modificado en diferentes descendientes  $F_1$  no explica el modo de herencia de esta mutación.

40 Para investigar más a fondo el patrón de segregación de la mutación que conduce al fenotipo de floración modificada de *Osteospermum*, se cruzaron cuatro genotipos de floración modificada estables con cuatro genotipos de *Osteospermum* de floración normal y se cruzaron cinco genotipos de floración modificada entre sí. Los progenitores reproductores fueron seleccionados de nuevo de acuerdo con su distancia genética basándose en el análisis de Gawenda y Debener (Gawenda, I. y Debener, T., *Genetic diversity of Osteospermum genotypes analysed by AFLP and chloroplast SSR markers, Europ. J. Hort. Sci.*, 74 (2), 86-94 (2009)). Dado que las plántulas de floración modificada ya no eran quiméricas, la proporción de segregación en su descendencia para los genotipos de floración normal debería corresponder a una proporción de 1:1 como en el caso de la herencia dominante. La polinización, la cosecha de semillas y la siembra, así como el cultivo de las plántulas, se realizaron tal como se ha descrito anteriormente para la progenie  $F_1$ . La progenie se evaluó por sus tipos de flores. Los resultados mostraron que toda la progenie resultante de un cruce de un progenitor de floración modificada y uno normal correspondía a una proporción de segregación de 1:1. En el caso de la progenie de cruces de dos progenitores con flores modificadas, tres de cada cuatro poblaciones correspondían a una proporción de segregación de 3:1. Las proporciones observadas en este análisis confirman una herencia de dominancia monogénica de la mutación responsable del fenotipo de floración modificado de *Osteospermum*.

55 En la mitad superior de la Tabla 2, la columna 1 muestra el número de plantas que presentan el fenotipo de floración modificado resultante de cruces entre una planta  $F_1$  de floración modificada con una planta de floración normal, mientras que la columna 2 muestra el número de plantas que presentan el fenotipo de floración normal y la columna 3 muestra el número total de plantas resultantes de los cruces. La columna 4 muestra los valores de  $\chi^2$  al cuadrado correspondientes a la segregación 1:1 esperada de fenotipos de floración modificados a fenotipos de floración normal para cada fila. En la mitad inferior de la Tabla 2, se realizó el mismo análisis para los cruces entre dos plantas que presentaban el fenotipo de floración modificado.

65 Ejemplo 2 - Análisis de marcador molecular del tipo de flor en *Osteospermum*: identificación de un marcador AFLP vinculado al alelo KLEDF

El objetivo de este proyecto era la identificación de marcadores vinculados al rasgo de floración modificado en *Osteospermum* mediante el uso de un enfoque de análisis segregante masivo (BSA). Los marcadores se identificaron mediante el uso de BSA en el que se utilizaron las poblaciones F2 propias 511, 499 y 503 derivadas de un cruce entre un progenitor de *Osteospermum* de floración modificada y un progenitor de *Osteospermum* de floración normal (Tabla 2) para detectar los marcadores de ADN vinculados al *locus* que controlaba el fenotipo de flor modificado. En estas poblaciones, se llevó a cabo el cribado de marcadores AFLP, incluyendo sus progenitores (n = 279).

10 Extracción de ADN y análisis de AFLP:  
El ADN genómico se aisló del material de la hoja usando un protocolo CTAB modificado (Stewart y Via (1993) *Biotechniques* 14(5): 748-750). El análisis de AFLP se realizó de acuerdo con el protocolo estándar descrito por Vos y col. (1995) *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414 con los siguientes detalles:

15 Adaptador EcoRI:

5'-CTCGTAGACTGCGTACC (SEQ ID No. 6)  
3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5' (como 5' a 3': SEQ ID No. 7)

20 Oligonucleótidos adaptadores EcoRI:

5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' (SEQ ID No. 6)  
5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3' (SEQ ID No. 7)

25 Adaptador Msel:

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' (SEQ ID No. 8)  
3'-TACTCAGGACTCAT-5' (como 5' a 3': SEQ ID No. 9)

30 Oligonucleótidos adaptadores Msel:

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' (SEQ ID No. 8)  
5'-TACTCAGGACTCAT-3' (SEQ ID No. 9)

35 Cebadores de preamplificación:

E01L: 5'-AGACTGCGTACCAATTCA-3' (SEQ ID No. 10)  
M02: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3' (SEQ ID No. 11)

40 Oligos de AFLP PCR finales:

E40: 5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3' (SEQ ID No. 1)  
M54: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3' (SEQ ID No. 2)

45 Resultados:

Se encontró un marcador AFLP (E40/M54-151) que podía discriminar claramente entre el fenotipo de floración normal y modificado en *Osteospermum*. Después de la separación en gel de poliacrilamida desnaturizante, este marcador mostró una banda de tamaño de aproximadamente 151 pares de bases en individuos de floración modificada, que estaba ausente en todos los de floración normal (véase la Figura 15). Por lo tanto, este marcador AFLP podría usarse inmediatamente en la reproducción para identificar genotipos que presentaban un fenotipo de floración modificado.

55 Ejemplo 3 - análisis de marcadores moleculares del tipo de flor en *Osteospermum*: identificación del marcador SNP vinculado al alelo KLEDF

Para identificar marcadores moleculares ligados al fenotipo de floración modificado en *Osteospermum*, se utilizó un enfoque de gen candidato (CG) como alternativa al enfoque de marcadores AFLP. La hipótesis de trabajo asumió que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o la inserción/delección (Indel) dentro de la secuencia del gen candidato están asociados con el fenotipo de interés. Hasta donde se sabe, no ha habido ningún estudio que involucre genes responsables de la alteración de la morfología floral en *Osteospermum*. Entre otros miembros de *Asteraceae*, como el girasol y la Gerbera, se han registrado fenotipos que muestran una morfología floral modificada. Se han notificado varios genes importantes que se supone que están involucrados en el cambio de la morfología floral (Kotilainen y col. (2000) *Plant Cell* 12:1893-1902; Theißen (2001) *Current Opinion in Plant Biology* 4:75-85; Teeri y col. (2002) En: Cronck QCB, Bateman RM, Hawkins JA, eds. *Developmental genetics and plant evolution*. Londres: Taylor & Francis, 220-232; Fambrini y col. (2003) *Genesis* 36:25-33; Uimari y col. (2004) *Proc. Natl. Acad.*

*Sci. USA* 101:15817-15822; Broholm y col. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:9117-9122). A partir de estos estudios, se seleccionan los genes GAGA1, CYCLODEA y GRCD2 como posibles candidatos que provocaban cambios en la morfología floral en *Osteospermum*.

- 5 Dado que no se ha constatado que estos genes se hayan estudiado en *Osteospermum*, se utilizaron secuencias de Gerbera para estos tres genes con el fin de diseñar cebadores para homólogos de *Osteospermum* de estos genes. El ADN genómico se extrajo del material de la hoja utilizando un protocolo de extracción estándar. Al final de este experimento, solo se pudo amplificar y secuenciar con éxito un gen (CYCLODEA) homólogo en *Osteospermum*. En este fragmento (de aproximadamente 330 pb de longitud) se identificó un SNP (nucleótido T para la planta de floración normal a C para la planta de floración modificada) que muestra un fuerte vínculo con los genotipos de *Osteospermum* de floración modificada.

Secuencia de cebadores y condiciones de PCR:

- 15 Cebador directo:  
CYC2f6- 5'-AAGATCGACACAGCTCACGG-3' (SEQ ID No. 3)  
Cebador inverso:  
CYC2r7- 5'-TCTGCCCTTGACTGATTCAC-3' (SEQ ID No.4)

- 20 Las amplificaciones de la reacción en cadena de la polimerasa se realizaron en volúmenes de reacción de 25 µl que consistían en 2 µl (25-30 ng/µl) de ADN genómico, 5 µl de tampón GoTaq 5x, 1,5 µl de dNTP (25 µM), 0,5 µl de cebador CYC2f6 (10 µM), 0,5 µl de cebador CYC2r7 (10 µM), 0,2 µl de GoTaq (5U/µl) y 15,3 µl de H<sub>2</sub>O. El protocolo de amplificación consistió en 35 ciclos con un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C seguido de 34 ciclos a 94 °C durante 1 min para la desnaturalización, seguido de hibridación específica del cebador a 60 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 2 min. Después de 35 ciclos, se realizó una última etapa de extensión de 10 min a 72 °C.

### Análisis del polimorfismo en CYC2

- 30 Todos los datos de secuencia de los individuos involucrados en el análisis se reunieron, editaron y prepararon para el cribado de SNP. En el fragmento de secuencia del gen CYC2 se encontró un SNP con base de nucleótidos C que está estrechamente ligado al fenotipo de floración modificada. En los individuos de floración normal hay una T en esta posición. La posición del SNP dentro de SEQ ID No. 10 se muestra a continuación en la Tabla 3.

- 35 Tabla 3: Posición de SNP dentro de la secuencia TTTGANAAAG (SEQ ID No. 10)

Tipo de flor	Bases adyacentes 5' del SNP	SNP	Bases adyacentes 3' del SNP
Normal	TTTGA	T	AAAG
Modificada	TTTGA	<b>e</b>	AAAG

- 40 Ejemplo: A continuación, se muestra una alineación de secuencia del fragmento del gen CYC2 de una planta de *Osteospermum* con floración normal (SEQ ID No. 11) con la de una planta de floración modificada (SEQ ID No. 5) y la posición del SNP se indica en negrita. La alineación de la secuencia se realizó utilizando los algoritmos de alineación por pares EMBOSS disponibles en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>.



5 plantas en estos genotipos de floración modificada en comparación con las plantas de *Osteospermum* de floración normal. Tal como se muestra en la Tabla 4, de forma inesperada, el grupo de floración modificada difiere consistentemente del de floración normal en la longitud de los flósculos discales, mientras que todas las demás características de la planta muestran la misma variación en los genotipos de floración modificada que en los de floración normal.

10 A partir de la progenie descrita anteriormente, se seleccionaron y evaluaron 10 genotipos de *Osteospermum* de floración modificada en diferentes condiciones ambientales en Europa del Norte y del Sur, África Oriental y Estados Unidos que abarcan un amplio intervalo de temperaturas y diferentes regímenes de luz. Las plantas se cultivaron tanto en el invernadero como en el campo. El rasgo de floración modificada se expresó siempre, mientras que el nivel de expresión, así como la expresión de los diferentes fenotipos descritos anteriormente variaron dependiendo de las condiciones de crecimiento. Estas observaciones indican que el alelo KLEDF mutante de la presente invención es genéticamente estable.

15 Ejemplo 5 - genotipo OE 2008 248

20 Mediante el procedimiento de reproducción descrito anteriormente, se desarrolló el genotipo OE 2008 248 de *Osteospermum*. OE 2008 248 muestra el fenotipo de flor modificada de la presente invención que presenta flósculos discales agrandados.

TABLA 5  
DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DEL GENOTIPO OE 2008 248

**PLANTA:**  
Nivel de ploidía: 4x  
Número de brotes basales: 6  
Longitud del internodo: de 0,05 cm a 1,0 cm

**FOLLAJE:**  
Hojas inmaduras:  
Longitud: 3,5 cm  
Ancho: 0,9 cm  
Hojas maduras:  
Longitud: de 4,8 cm a 5,0 cm  
Ancho: de 1,6 cm a 1,9 cm  
Color: RHS 146A

**FLÓSCULOS RADIALES:**  
Número: de 14 a 16  
Longitud: 3,0 cm  
Ancho: 0,7 cm  
Color de la superficie superior: RHS 92D  
Color de la superficie inferior: RHS 85A

**FLÓSCULOS DISCALES:**  
Número: de 80 a 85  
Longitud: de 1,3 cm a 2,1 cm  
Longitud media: 1,7 cm  
Color de la superficie interior: RHS 85D  
Color de la superficie exterior: RHS 91A

Ejemplo 6 - genotipo OE 2008 258

25 Mediante el procedimiento de reproducción descrito anteriormente, se desarrolló el genotipo OE 2008 258 de *Osteospermum*. OE 2008 258 muestra el fenotipo de flor modificada de la presente invención que presenta flósculos de disco agrandados.

TABLA 6  
DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DEL GENOTIPO OE 2008 258

**PLANTA:**  
Nivel de ploidía: 4x  
Número de brotes basales: 6  
Longitud del internodo: de 0,05 cm a 1,0 cm

**FOLLAJE:**  
Hojas inmaduras:  
Longitud: 3,2 cm  
Ancho: 0,8 cm  
Hojas maduras:  
Longitud: 5,2 cm  
Ancho: de 1,9 cm a 2,0 cm

(continuación)

Color: RHS 144A  
**FLÓSCULOS RADIALES:**  
 Número: de 17 a 18  
 Longitud: de 2,6 cm a 2,7 cm  
 Ancho: de 0,7 cm a 0,8 cm  
 Color de la superficie superior: RHS 92D  
 Color de la superficie inferior: RHS 76A  
**FLÓSCULOS DISCALES:**  
 Número: de 73 a 89  
 Longitud: de 1,0 cm a 1,9 cm  
 Longitud media: 1,45 cm  
 Color de la superficie interior: RHS 85D  
 Color de la superficie exterior: RHS 91A

Ejemplo 7 - genotipo OE 2008 274

- 5 Mediante el procedimiento de reproducción descrito anteriormente, se desarrolló el genotipo OE 2008 274 de *Osteospermum*. OE 2008 274 muestra el fenotipo de flor modificado de la presente invención que presenta flósculos de disco agrandados.

TABLA 7

DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DEL GENOTIPO OE 2008 274

**PLANTA:**  
 Nivel de ploidía: 4x  
 Número de brotes basales: 5  
 Longitud del internodo: de 0,5 cm a 1,0 cm  
**FOLLAJE:**  
 Hojas inmaduras:  
 Longitud: 3,2 cm  
 Ancho: de 0,8 cm a 0,9 cm  
 Hojas maduras:  
 Longitud: de 4,5 cm a 4,9 cm  
 Ancho: 2,0 cm  
 Color: RHS 146A  
**FLÓSCULOS RADIALES:**  
 Número: 25  
 Longitud: de 2,6 cm a 2,9 cm  
 Ancho: de 0,7 cm a 0,9 cm  
 Color de la superficie superior: RHS 78B  
 Color de la superficie inferior: RHS 82A  
**FLÓSCULOS DISCALES:**  
 Número: de 95 a 96  
 Longitud: de 1,3 cm a 1,7 cm  
 Longitud media: 1,5 cm  
 Color de la superficie interior: RHS 78A  
 Color de la superficie exterior: RHS 82D

- 10 Ejemplo 8 - genotipo OE 2008 285
- 15 Mediante el procedimiento de reproducción descrito anteriormente, se desarrolló el genotipo OE 2008 285 de *Osteospermum*. OE 2008 285 muestra el fenotipo de flor modificado de la presente invención que presenta flósculos de disco agrandados.

TABLA 8

DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DEL GENOTIPO OE 2008 285

**PLANTA:**  
 Nivel de ploidía: 4x  
 Número de brotes basales: 5  
 Longitud del internodo: de 0,5 cm a 1,0 cm  
**FOLLAJE:**  
 Hojas inmaduras:  
 Longitud: de 4,0 cm a 4,5 cm  
 Ancho: de 1,2 cm a 1,6 cm  
 Hojas maduras:  
 Longitud: de 7,0 cm a 7,5 cm

(continuación)

Ancho: de 2,5 cm a 3,5 cm  
 Color: RHS 137A  
**FLÓSCULOS RADIALES:**  
 Número: de 22 a 25  
 Longitud: de 2,6 cm a 3,0 cm  
 Ancho: de 0,6 cm a 0,8 cm  
 Color de la superficie superior: RHS N74B  
 Color de la superficie inferior: RHS 84A  
**FLÓSCULOS DE DISCO:**  
 Número: de 78 a 85  
 Longitud: de 0,8 cm a 2,2 cm  
 Longitud media: 1,5 cm  
 Color de la superficie interior: RHS 72A  
 Color de la superficie exterior: RHS 84A

Ejemplo 9 - genotipo OE 2008 384

- 5 Mediante el procedimiento de reproducción descrito anteriormente, se desarrolló el genotipo OE 2008 384 de *Osteospermum*. OE 2008 384 muestra el fenotipo de flor modificado de la presente invención que presenta flósculos de disco agrandados.

TABLA 9

DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DEL GENOTIPO OE 2008 384

**PLANTA:**  
 Nivel de ploidía: 4x  
 Número de brotes basales: 4  
 Longitud del internodo: de 0,5 cm a 1,0 cm  
**FOLLAJE:**  
 Hojas inmaduras:  
 Longitud: 3,4 cm  
 Ancho: de 1,1 cm  
 Hojas maduras:  
 Longitud: 4,1 cm  
 Ancho: 2,1 cm  
 Color de la superficie superior: RHS 146A  
**FLÓSCULOS RADIALES:**  
 Número: de 23 a 27  
 Longitud: 2,1 cm  
 Ancho: de 0,6 cm a 0,7 cm  
 Color de la superficie superior: RHS 72A  
 Color de la superficie inferior: RHS N80D  
**FLÓSCULOS DISCALES:**  
 Número: de 94 a 108  
 Longitud: de 1,4 cm a 1,7 cm  
 Longitud media: 1,55 cm  
 Color de la superficie interior: RHS 72A  
 Color de la superficie exterior: RHS 84B

10

Ejemplo 10 - genotipo OE 2008 390

- 15 Mediante el procedimiento de reproducción descrito anteriormente, se desarrolló el genotipo OE 2008 390 de *Osteospermum*. OE 2008 390 muestra el fenotipo de flor modificado de la presente invención que presenta flósculos de disco agrandados.

TABLA 10

DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DEL GENOTIPO OE 2008 390

**PLANTA:**  
 Nivel de ploidía: 4x  
 Número de brotes basales: 5  
 Longitud del internodo: de 0,5 cm a 1,0 cm  
**FOLLAJE:**  
 Hojas inmaduras:  
 Longitud: 3,3 cm  
 Ancho: de 0,9 cm a 1,1 cm  
 Hojas maduras:

(continuación)

Longitud: 6,5 cm  
 Ancho: de 2,0 cm a 2,5 cm  
 Color de la superficie superior: RHS 146A

**FLÓSCULOS RADIALES:**

Número: de 19 a 22  
 Longitud: 2,6 cm  
 Ancho: de 0,8 cm a 0,9 cm  
 Color de la superficie superior: RHS 77c y RHS 75D  
 Color de la superficie inferior: RHS 85A

**FLÓSCULOS DE DISCO:**

Número: de 68 a 100  
 Longitud: de 1,4 cm a 1,8 cm  
 Longitud media: 1,6 cm  
 Color de la superficie interior: RHS 77C  
 Color de la superficie exterior: RHS 85A

Ejemplo 11 - incorporación del alelo mutante KLEDF en plantas de *Osteospermum*

- 5 Los cultivares de floración modificada que presentan el alelo mutante denominado KLEDF de la presente invención mantienen órganos femeninos y masculinos funcionales. Por lo tanto, el rasgo de floración modificada se puede incorporar a los cultivares de *Osteospermum* mediante el reproducción convencional, aunque la ejecución/implementación de estos cruces requiere habilidades específicas de los respectivos polinizadores. Mediante cruzamiento, el alelo KLEDF de la presente invención puede incorporarse a una amplia gama de plantas de *Osteospermum* que presentan diferentes colores y formas de flores (por ejemplo, tipos araña) así como a diferentes tipos de follaje. Además, el alelo mutante puede incorporarse a plantas que presentan diferentes hábitos de crecimiento, por ejemplo, pueden desarrollarse portes de tipo postrado o colgante además de los de tipo erecto o semierecto.
- 10
- 15 Utilizando procedimientos de reproducción convencionales, una planta de *Osteospermum* de floración modificada que presenta el alelo mutante KLEDF de la presente invención se cruza con una planta de *Osteospermum* de floración normal que carece del alelo mutante de la presente invención. Las semillas resultantes se siembran y las plántulas se cultivan según procedimientos convencionales. La progenie F<sub>1</sub> de floración se califica luego para las plantas de floración modificada. Las plantas F<sub>1</sub> seleccionadas se cruzan adicionalmente o se pueden cruzar de nuevo con su floración modificada o con su progenitor de floración normal con el fin de combinar el fenotipo de floración modificado con otras características deseables de la planta. Sin embargo, dependiendo de la distancia genética entre los progenitores, podría producirse depresión por consanguinidad en esta progenie de retrocruzamiento. De manera alternativa, las plantas seleccionadas de esta progenie F<sub>1</sub> pueden cruzarse con plantas seleccionadas de una progenie F<sub>1</sub> diferente o con otro cultivar, que esté muy relacionado con la progenie F<sub>1</sub> respectiva.
- 20
- 25

Ejemplo 12 - incorporación del alelo mutante KLEDF en otras especies de *Osteospermum* para crear híbridos interespecíficos

- 30 El alelo mutante KLEDF de la presente invención puede introducirse en un híbrido interespecífico elaborado entre una especie de *Osteospermum* que presenta el alelo mutante de la presente invención y una especie de *Osteospermum* diferente. Una planta de *Osteospermum* seleccionada que presenta el alelo mutante KLEDF se cruza, utilizando procedimientos convencionales, como progenitor masculino o femenino, con un genotipo seleccionado de cualquier otra especie de *Osteospermum*. Dependiendo de la especie de *Osteospermum* de la que se seleccione el progenitor de cruce, las semillas se asentarán fácilmente, por ejemplo, en cruces con *O. jucundum*. Para los cruces con plantas de especies menos emparentadas, pueden ser necesarias técnicas específicas como polinización de yemas, eliminación del estigma y polinización del estilo restante, tratamientos GA<sub>3</sub> de los estigmas polinizados y/o rescate de embriones inmaduros. Las semillas resultantes del cruce se siembran y las plántulas se cultivan según procedimientos convencionales. La progenie F<sub>1</sub> de floración se puntúa luego para las plantas de floración modificadas. El procedimiento de reproducción adicional es similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 8.
- 35
- 40

Ejemplo 13 - incorporación del alelo mutante KLEDF en plantas de *Dimorphoteca* para crear híbridos intergenéricos

- 45 Además, el alelo KLEDF mutante de la presente invención también puede introducirse en un híbrido intergenérico a través de cruces entre una planta de *Osteospermum* seleccionada que presenta el alelo KLEDF mutante de la presente invención y una planta *Dimorphoteca* que carece del alelo mutante de la presente invención. Los procedimientos que se utilizarán para realizar estos híbridos corresponden a los procedimientos que se han descrito para cruces interespecíficos, es decir, técnicas específicas como polinización de yemas, eliminación del estigma y polinización del estilo restante, tratamientos GA<sub>3</sub> de los estigmas polinizados y/o rescate de embriones inmaduros pueden ser necesarias para realizar estas plántulas híbridas.
- 50

Ejemplo 14 - creación de plantas de la presente invención con la ayuda de marcadores moleculares

La incorporación del alelo mutante KLEDF de la presente invención en un trasfondo genético diferente requiere cruzamiento repetido o retrocruzamiento, lo que significa que el gen de interés debe seguirse durante varias generaciones en la progenie respectiva. Los marcadores moleculares son una herramienta muy poderosa para hacer la selección más eficiente y acelerar el procedimiento de reproducción. Debener (Debener, T., *Molecular markers as a tool for analysis of genetic relatedness and selection in ornamentals, Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches*, 329-345, *Kluwer Academic Publishers* (2002)) han descrito varios ejemplos exitosos de reproducción asistida por marcadores en ornamentales.

Los inventores han encontrado un marcador AFLP y un SNP que identifican claramente genotipos de floración modificados. Esto es de particular importancia para acelerar un programa de reproducción a través de la selección asistida por marcadores cuando se requiere la identificación de genotipos que presentan un fenotipo de floración modificado en una etapa temprana.

La aplicación de estas técnicas permitirá el mapeo molecular del alelo mutante de *Osteospermum* KLEDF descrito de la presente invención.

Ejemplo 15 - creación de plantas de la presente invención utilizando Protoplast Fusion

En algunas especies de plantas, la fusión de protoplastos es una técnica poderosa para combinar los genes de dos especies diferentes en lugar de realizar cruces entre plantas de las respectivas especies (Horita, M., Morohashi, H. y Komai, F., *Production of fertile somatic hybrid plants between oriental hybrid lily and Liliun x formolongi, Planta*, 597-601 (2003); Griesbach, R.J., *Recent advances in the protoplast biology of flower crops, Scientia Horticulturae*, 37, 247-256 (1988); Kumar, A. y Cocking, EC, *Protoplast Fusion: A Novel Approach to Organelle Genetics in Higher Plants, American Journal of Botany*, 741, 1289-1303 (1987)). Además de la adición de dos genomas completos, pueden combinarse partes de ambos genomas. El requisito previo es un protocolo eficaz para la regeneración de plantas a partir de protoplastos individuales. Incluso la transmisión de un solo cromosoma de una pareja al genoma de la segunda pareja o la incorporación del genoma de una pareja al citoplasma de la segunda pareja, así como un citoplasma en parche pueden lograrse mediante la fusión de protoplastos (véase, por ejemplo, Lössl A., Adler, N., Horn, R., Frei, U., y Wenzel, G., *Chondriome-type characterization of potato: Mta,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  and novel plastid mitochondrial configurations in somatic hybrids, Theoretical and Applied Genetics*, 99: 1-10 (1999)).

Se ha descrito la fusión de protoplastos en el género *Dimorphoteca* (J. S. Al-Atabee y J. B. Power. (1987) *Plant Cell Reports* 6: 414-416). Sin embargo, dado que las plantas tanto del género *Osteospermum* como del género *Dimorphoteca* se propagan de forma rutinaria en cultivo de tejidos y pueden regenerarse fácilmente a partir de explantes de hojas, la regeneración de protoplastos, así como la fusión de protoplastos, también podrían ser posibles en el género *Osteospermum* (Allavena, A. y col. (2000) *Acta Hort.* 508: 129-133; Giovannini, A. y col. (1999) *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35:70-75). La fusión de protoplastos de una planta de *Osteospermum* que presenta el alelo mutante KLEDF de la presente invención con protoplastos de una planta de *Osteospermum* o *Dimorphoteca* que carece del alelo mutante de la presente invención, la regeneración de las plantas de las mismas y la selección de individuos de flores modificadas entre estos productos de fusión regenerados, permiten la transmisión del alelo mutante de la presente invención a nuevos fondos genéticos.

Ejemplo 16 - uso de mutágenos en plantas de la presente invención para crear plantas modificadas

Las plantas de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* que presentan el alelo mutante KLEDF de la presente invención pueden utilizarse para inducir mutaciones adicionales, dando lugar a más formas de flores modificadas o nuevos colores de flores, hábitos de crecimiento modificados, características del follaje, etc. Los mutantes pueden aparecer espontáneamente o las mutaciones pueden ser inducidas con irradiación Gamma o mediante el tratamiento con ciertos agentes químicos como el metanosulfonato de etilo (EMS) (Broertjes, C. y van Harten, A.M., *Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops, Developments in Crop Science* 12, *Elsevier Science Publishers B.V.* (1988)). Mientras que estos tratamientos inducen principalmente mutaciones puntuales o mutaciones cromosómicas, pueden producirse mutaciones genómicas como la duplicación del número de cromosomas, por ejemplo, mediante tratamiento con colchicina. Incluso el cultivo de tejidos puede inducir mutaciones, que generalmente se describen como variación somaclonal (Chen, WH, Chen, TM, Fu, YM y Hsieh, RM, *Studies on somaclonal variation in Phalaenopsis, Plant Cell Rep*, 18, 7-13 (1998)).

Ejemplo 17 - uso de la transformación en las plantas de la presente invención

En las últimas décadas, la transformación genética ha sido una técnica muy poderosa para transferir genes individuales de una planta a otra con independencia de las barreras de cruce. Además de los genes para proteínas estructurales únicas, que podrían modificar el color de las flores o inducir resistencias bióticas específicas, se han transferido con éxito genes que codifican factores de transcripción, que manipulan una gama más amplia de caracteres vegetales complejos, incluso entre diferentes familias de plantas u organismos.

Se ha desarrollado un protocolo para la transformación genética de *Osteospermum* y se han introducido varios genes, incluyendo el gen marcador  $\beta$ -glucuronidasa así como el gen rolB, en esta especie vegetal mediante transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Se ha desarrollado brevemente el siguiente protocolo: se incuban segmentos de hojas de plantas de cultivo de tejidos de *Osteospermum* con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* desarmada que porta un vector con el gen de interés y un gen que codifica un marcador seleccionable específico, por ejemplo, nptII para la selección con kanamicina. Mediante la regeneración bajo presión de selección de acuerdo con el marcador seleccionable, las plantas transgénicas pueden regenerarse a partir de células transformadas individuales (Allavena, A. y col. (2000) *Acta Hort.* 508: 129-133; Giovannini, A. y col. (1999) *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35:70-75). La aplicación de técnicas de transformación alternativas como el bombardeo de partículas aún no se ha descrito para *Osteospermum* ni *Dimorphoteca*, pero puede ser posible.

El uso de la transformación genética es imaginable en ambas direcciones: los genes extraños pueden transferirse a una planta de *Osteospermum* o *Dimorphoteca* que presenta el alelo mutante KLEDF de la presente invención y dar lugar a una planta con características completamente nuevas. De manera alternativa, el alelo KLEDF mutante de la presente invención o su ADNc respectivo puede transferirse a fondos genéticos extraños e inducir flores modificadas en las plantas transgénicas resultantes.

#### Ejemplo 18 - incorporación del alelo mutante KLEDF en plantas de *Dimorphoteca*

Mediante hibridación intergenérica, el alelo mutante denominado KLEDF de la presente invención puede introducirse en el género *Dimorphoteca*. Además, el rasgo de floración modificado puede incorporarse en una amplia gama de cultivares de *Dimorphoteca* mediante reproducción convencional. Mediante cruzamiento, el alelo KLEDF de la presente invención puede incorporarse en cultivares de *Dimorphoteca* que presentan diferentes colores y formas de flores, así como diferentes tipos de follaje. Además, el alelo mutante puede incorporarse en plantas que presentan diferentes hábitos de crecimiento, por ejemplo, pueden desarrollarse portes de tipo postrado o colgante además de los portes de tipo erecto o semierecto.

Utilizando procedimientos de reproducción convencionales, una planta de *Dimorphoteca* que presenta el alelo mutante KLEDF de la presente invención se cruza con una planta de *Dimorphoteca* que carece del alelo mutante de la presente invención. Las semillas resultantes se siembran y las plántulas se cultivan según procedimientos convencionales. La progenie F<sub>1</sub> de floración se puntúa luego para las plantas de floración modificadas. Las plantas F<sub>1</sub> seleccionadas se cruzan adicionalmente o pueden volver a cruzarse con su progenitor de floración modificada o con su progenitor de floración normal para combinar el fenotipo de floración modificado con otras características deseables de la planta. Sin embargo, dependiendo de la distancia genética entre los progenitores, puede ocurrir depresión por consanguinidad en esta progenie de retrocruzamiento. De manera alternativa, las plantas seleccionadas de esta progenie F<sub>1</sub> pueden cruzarse con plantas seleccionadas de una progenie F<sub>1</sub> diferente o con otro cultivar, que esté muy relacionado con la progenie F<sub>1</sub> respectiva.

#### Ejemplo 19 - incorporación del alelo mutante KLEDF en plantas de *Dimorphoteca* para crear híbridos interespecíficos

El alelo mutante KLEDF de la presente invención puede introducirse en un híbrido interespecífico elaborado entre una especie de *Dimorphoteca* que presenta el alelo mutante de la presente invención y una especie de *Dimorphoteca* diferente. Una planta de *Dimorphoteca* seleccionada que presenta el alelo mutante KLEDF se cruza, usando procedimientos convencionales, como progenitor masculino o femenino, con un genotipo seleccionado de cualquier otra especie de *Dimorphoteca*. Para los cruces con plantas de especies menos emparentadas, pueden ser necesarias técnicas específicas como polinización de yemas, eliminación del estigma y polinización del estilo restante, tratamientos GA<sub>3</sub> de los estigmas polinizados y/o rescate embrionario de embriones inmaduros. Las semillas resultantes del cruce se siembran y las plántulas se cultivan según procedimientos convencionales. La progenie F<sub>1</sub> de floración se puntúa luego para las plantas de floración modificada. El procedimiento de reproducción adicional es similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 18. Sin embargo, dado que el género *Dimorphoteca* representa especies con diferentes niveles de ploidía que varían de 2x a 6x, los híbridos resultantes podrían ser, por ejemplo, triploides y no producir semillas viables. Por lo tanto, para la reproducción posterior, el número de cromosomas de estas plantas debe, por ejemplo, duplicarse mediante el tratamiento con colchicina.

#### Ejemplo 20 - incorporación del alelo mutante KLEDF en plantas de *Osteospermum* para crear híbridos intergenéricos

Además, el alelo KLEDF mutante de la presente invención también puede introducirse en un híbrido intergenérico mediante cruces entre una planta *Dimorphoteca* seleccionada que presenta el alelo KLEDF mutante de la presente invención y una planta *Osteospermum* que carece del alelo mutante de la presente invención. Los procedimientos que se utilizarán para realizar estos híbridos corresponden a los procedimientos que se han descrito para cruces interespecíficos, lo que significa que pueden ser necesarias técnicas específicas como polinización de yemas, eliminación del estigma y polinización del estilo restante, tratamientos GA<sub>3</sub> de los estigmas polinizados y/o rescate embrionario de embriones inmaduros, así como la duplicación de cromosomas con colchicina, para realizar estas plántulas híbridas.

Ejemplo 21 - comparación de la producción de semillas de genotipos de *Osteospermum* de floración normal y modificada

5 En el transcurso del trabajo de reproducción de *Osteospermum* de floración modificada se observó que *Osteospermum* de floración normal tiene un mayor rendimiento de semilla que *Osteospermum* de floración modificada. Para confirmar esto, se plantaron diez genotipos de *Osteospermum* de floración normal y diez genotipos de floración modificada en lechos en campo abierto sin ninguna barrera de aislamiento entre ellos. Se plantaron cuatro plantas por genotipo en una parcela. Además, también se plantaron de forma aislada genotipos de *Osteospermum* de floración modificada. Se recolectaron semillas maduras de cada planta de cada genotipo y se contaron. Se observó que no hubo diferencia en el rendimiento de semilla entre *Osteospermum* de floración modificada plantada junto con tipos de floración normal y aquellas plantadas de forma aislada (rendimiento medio de semilla/planta = 21). Sin embargo, el análisis estadístico de los datos de semillas mostró claramente que en ambas condiciones los genotipos de *Osteospermum* de floración modificada presentaban rendimientos de semilla significativamente más bajos que los genotipos de *Osteospermum* de floración normal.

Tabla 11: Rendimientos de semilla de los genotipos normales y modificados de *Osteospermum*

Tipo de flor	N	Número medio de semillas	Error estándar de la media	t	Importancia
Normal	10	233,22	44,36	4,76	0,001
Modificada	10	20,44	5,4		

Ejemplo 22 - comparación de la capacidad de conservación de las flores de genotipos de *Osteospermum* de floración normal y modificada

Se observó que las flores de *Osteospermum* de floración modificada presentan una capacidad de conservación más prolongada que las plantas de *Osteospermum* de floración normal. Para confirmar esta observación, se plantaron diez plantas de cuatro genotipos de *Osteospermum* de floración normal y cuatro de floración modificada en el invernadero (agosto-diciembre de 2010). Las plantas no se podaron y, por lo tanto, se les permitió crecer y dar flores en el tallo central. Estas flores se marcaron regularmente como, i) abiertas: cuando los botones florales comienzan a mostrar el color de los pétalos y se marcaron como ii) marchitas: cuando dos o tres pétalos comenzaron a mostrar síntomas de envejecimiento y la flor comenzó a parecer opaca. Para cada genotipo, la diferencia entre el día en que se abrió la flor y el día en que se marchitó se tomó como capacidad de conservación de la flor.

Tabla 12: Comparación de la capacidad de conservación de las flores de los genotipos de *Osteospermum* de floración normal y modificada

Tipo de flor	N	Media (días)	t	Importancia
Floración normal	4	11,98	-2,575	0,05
Floración modificada	4	15,30		

Ejemplo 23 - tratamiento regulador del crecimiento vegetal de *Osteospermum* de floración modificada

La pulverización semanal de un esqueje enraizado de *Osteospermum* de floración modificada con una solución al 0,2 % de regulador del crecimiento vegetal Daminozida (comercializado con el nombre Alar) transformó las flores de *Osteospermum* de floración modificada de nuevo a flores de apariencia fenotípicamente casi normal. En las plantas de un *Osteospermum* de floración modificada que se pulverizaron de esta manera, a veces una parte y a veces todos los flósculos discales alargados desaparecieron, de modo que los flósculos discales se parecían a los flósculos discales de una planta de *Osteospermum* de floración normal. En una flor de *Osteospermum* de floración modificada, el polen suele ser escaso, y limita seriamente el rendimiento de semilla resultante de los cruces que involucran un progenitor masculino de floración modificada. En contraste, las flores de una planta pulverizada con Alar contaban con cantidades de polen casi comparables a las que se ven en una planta que presenta un tipo normal de flores. Esto hace que el procedimiento de cruzamiento sea conveniente, ya que hay una gran cantidad de polen en las plantas con flores modificadas que están modificadas genéticamente, pero muestran el tipo normal de flores. Por lo tanto, una planta de floración modificada tratada con Daminozida puede cruzarse fácil y rápidamente con una planta de floración normal y también con otra planta de floración modificada.

## 50 INFORMACIÓN DE DEPÓSITO

Las semillas de *Osteospermum* que contienen el alelo mutante KLEDF de la presente invención y que pueden mostrar el fenotipo de flor modificado de la presente invención se han depositado en virtud del Tratado de Budapest con las Colecciones Nacionales de Bacterias Industriales, Alimentarias y Marinas (NCIMB), 23 St Machar Drive, Aberdeen, Escocia, AB24 3RY, Reino Unido con el número de acceso NCIMB 41698. La fecha de depósito fue el 26 de febrero de 2010.

TABLA 1. Segregación del tipo de flor y el color de la flor en la progenie F<sub>1</sub>

Color de los pétalos de la pareja de cruce de floración normal	N.º de plantas de floración normal				N.º de plantas de floración modificada				N.º total de plantas				Valores X <sup>2</sup> Correspondientes a una segregación 1:1 para el tipo de flor
	Blanco	Rosa	Violeta	Total	Blanco	Rosa	Violeta	Total	Blanco	Rosa	Violeta	Total	
	Blanco	174	23	41	238	46	5	44	95	220	28	85	
Violeta	3	8	263	274	3	3	68	74	6	11	331	348	*114,8
Rosado	3	217	33	253	1	7	6	14	4	224	39	267	*213,94
Blanco	59	28	35	122	23	7	21	51	82	35	56	173	*29,14
Bicolor blanco-violeta	16	12	0	28	3	12	0	15	19	24	0	43	*3,94
Violeta	0	9	61	70	0	2	9	11	0	11	70	81	*42,98
Rosado	57	59	24	140	5	15	3	23	62	74	27	163	*83,98
Rosado	6	47	41	94	0	8	7	15	6	55	48	109	*57,26
Marfil	110	0	0	110	23	0	0	23	133	0	0	133	*56,90

\*La progenie respectiva se desvía significativamente de una segregación 1:1 en X<sup>2</sup> = 3,84

TABLA 2. Segregación del tipo de floración modificada en la progenie F<sub>2</sub>

<b>Cruces entre plantas F<sub>1</sub> de floración modificada y plantas de floración normal</b>					
<b>Código de población</b>	<b>N.º de plantas de floración modificada</b>	<b>N.º de plantas de floración normal</b>	<b>N.º total de plantas</b>	<b>Valores <math>\chi^2</math> correspondientes a una patrón de segregación 1:1</b>	
468	64	54	118	0,84	
469	65	89	154	3,74	
471	83	90	173	0,28	
499	52	41	93	1,30	
501	48	44	92	0,18	
503	35	45	80	1,25	
504	74	72	146	0,16	
506	38	44	82	0,44	
511	107	96	203	0,58	
476	46	43	89	0,10	
<b>Cruces entre dos plantas F<sub>1</sub> de tipo de floración modificada</b>					
<b>Código de población</b>	<b>N.º de plantas de floración modificada</b>	<b>N.º de plantas de floración normal</b>	<b>N.º total de plantas</b>	<b>Valores <math>\chi^2</math> correspondientes a una patrón de segregación 3:1</b>	
8	129	44	173	0,01	
9	66	18	84	0,84	
3	15	52	67	0,24	

\*Las distintas combinaciones se desvían significativamente de la segregación 3:1 esperada en  $\chi^2 = 3,84$

TABLA 4. Comparación de ciertas características de plantas entre genotipos de *Osteospermum* de floración normal y modificada

Código	Tipo	Flósculos radiales				Flósculos discales				Follaje - inmaduro				Follaje - maduro		N.º de brotes basales
		N.º	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Color (RHS)	N.º	Longitud (cm)	Longitud media (cm)	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Longitud (cm)	
OE 2008248	AF	14-16	3,0	0,7	92D	80-85	1,3-2,1	1,7	3,5	0,9	4,8-5,0	1,6-1,9	146A	6		
OE 2008258	AF	17-18	2,6-2,7	0,7-0,8	92D	73-89	1,0-1,9	1,45	3,2	0,8	5,2	1,9-2,0	144A	5		
OE 2008274	AF	25	2,6-2,9	0,7-0,9	78B	95-96	1,3-1,7	1,5	3,2	0,8-0,9	4,5-4,9	2,0	146A	5		
OE 2008285	AF	22-25	2,6-3,0	0,6-0,8	N74B	78-85	0,8-2,2	1,5	4,0-4,5	1,2-1,6	7,0-7,5	2,5-3,5	137A	5		
OE 2008384	AF	23-27	2,1	0,6-0,7	72A	94-108	1,4-1,7	1,55	3,4	1,1	4,1	2,1	146A	4		
OE 2008390	AF	19-22	2,6	0,8-0,9	77C+75D	68-100	1,4-1,8	1,6	3,3	0,9-1,1	6,5	2,0-2,5	146A	5		
A-5-43	NF	17-20	3,2-3,3	1,0	155D	65-90	0,5-0,6	0,55	3,3-3,9	1,0-1,2	6,0-7,0	2,3-2,5	146A	4		
V 78	NF	19-22	3,3-3,4	1,1-1,2	155D	81-89	0,4-0,6	0,5	3,5-4,0	0,9-1,2	6,2-7,3	2,1-2,4	N137B	5		
W 113	NF	18-21	2,4-2,9	0,7-0,9	157C	40-45	0,4-0,5	0,45	3,2-3,6	0,8-1,0	5,5-6,0	1,6-1,8	146A	6		
A-48-24	NF	20-23	2,6	0,6-0,8	71A/N81A	77-96	0,5-0,6	0,55	2,4-2,9	0,8-1,0	5,5-6,5	2,0-3,0	146A	4		
X 95	NF	23-25	3,4-3,7	0,9	N78A/83	65-79	0,5-0,6	0,55	3,1-3,5	1,0-1,1	5,9-6,4	2,5	147A	4		
A-69-1	NF	21-25	2,7	0,8	72A/N78A	93-107	0,6	0,6	2,8	0,7-1,1	6,3-6,6	2,5	147A	4		
V 34	NF	19-20	2,6-2,8	0,8-0,9	70B/N82A	72-81	0,4-0,5	0,45	2,5-2,7	0,6	6,1-6,4	2,6	N137B	5		
W 42	NF	16-20	2,4-2,6	0,7	78B/78C/ 80C	58-75	0,5-0,6	0,55	2,8	0,9-1,0	4,3-4,6	1,6-1,8	146A	5		
A-46-1	NF	19-20			N74C+155D/ N82B	63-70	0,5	0,5	2,3-2,8	0,7-0,8	5,8-6,3	2,5-2,7	147A	4		

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Klemm & sohn GmbH & Co. KG

5 <120> Plantas de *Osteospermum* y *Dimorphoteca* que presentan un fenotipo de flor modificado

<130> S 10007/RN

10 <150> EP10158786.3  
<151> 31-10-2010

<150> US 12/750,965  
<151> 31-10-2010

15 <160> 11

<170> PatentIn version 3.5

20 <210> 1  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

25 <220>  
<223> cebador E40

<400> 1  
gactgcgtac caattcagc 19

30 <210> 2  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> artificial

35 <220>  
<223> cebador M54

40 <400> 2  
gatgagtctt gagtaacct 19

<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial

45 <220>  
<223> cebador CYC2f6

50 <400> 3  
aagatcgaca cagctcacgg 20

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial

55 <220>  
<223> cebador CYC2r7

60 <400> 4  
tctgcccttg actgattcac 20

<210> 5  
<211> 330  
<212> DNA  
<213> artificial

65

ES 2 895 517 T3

<220>  
 <223> Producto de PCR de SEQ ID Nos. 3 y 4

5      <220>  
          <221> misc-feature  
          <222> (2)..(3)  
          <223> n es a, c, g, o t

10     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (10)..(10)  
          <223> n es a, c, g, o t

15     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (23)..(24)  
          <223> n es a, c, g, o t

20     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (30)..(30)  
          <223> n es a, c, g, o t

25     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (36)..(36)  
          <223> n es a, c, g, o t

30     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (38)..(39)  
          <223> n es a, c, g, o t

35     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (41)..(41)  
          <223> n es a, c, g, o t

40     <220>  
          <221> misc-feature  
          <222> (79)..(79)  
          <223> n es a, c, g, o t

45     <400> 5

tnn <span style="font-family: monospace;">gctgctn</span>	gtg <span style="font-family: monospace;">ccgggaa</span>	tann <span style="font-family: monospace;">cgtgcn</span>	ggg <span style="font-family: monospace;">cgnnnt</span>	nttt <span style="font-family: monospace;">cagggc</span>	aga <span style="font-family: monospace;">gcattt</span>	60
gct <span style="font-family: monospace;">agggttt</span>	gaca <span style="font-family: monospace;">aagtnt</span>	tgca <span style="font-family: monospace;">aaaccc</span>	ttgat <span style="font-family: monospace;">tggct</span>	cttt <span style="font-family: monospace;">accaag</span>	tcca <span style="font-family: monospace;">agaccg</span>	120
caat <span style="font-family: monospace;">taagga</span>	gtt <span style="font-family: monospace;">ggttgaa</span>	gaa <span style="font-family: monospace;">atgaaac</span>	acagt <span style="font-family: monospace;">tcac</span>	ttct <span style="font-family: monospace;">ggtgct</span>	act <span style="font-family: monospace;">gatcaat</span>	180
gtg <span style="font-family: monospace;">aggtttt</span>	tcag <span style="font-family: monospace;">gagacc</span>	atcat <span style="font-family: monospace;">gagga</span>	tatca <span style="font-family: monospace;">aatga</span>	aaa <span style="font-family: monospace;">agataaa</span>	ggc <span style="font-family: monospace;">gaaaaga</span>	240
aga <span style="font-family: monospace;">agtcagt</span>	acc <span style="font-family: monospace;">caatgtt</span>	ctt <span style="font-family: monospace;">gaaggaa</span>	aaa <span style="font-family: monospace;">agaaaaa</span>	aact <span style="font-family: monospace;">gcccga</span>	aaat <span style="font-family: monospace;">ataaat</span>	300
ctg <span style="font-family: monospace;">gagtcga</span>	tgt <span style="font-family: monospace;">aatcag</span>	tca <span style="font-family: monospace;">agggcag</span>				330

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> artificial

50      <220>  
          <223> adaptador EcoRI 1

<400> 6  
 ctcgtagact gcgtacc 17

5 <210> 7  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> adaptador EcoRI 2

<400> 7  
 aattgtacg cagtctac 18

15 <210> 8  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> adaptador Msel 1

<400> 8  
 gacgatgagt cctgag 16

25 <210> 9  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> adaptador Msel 2

<400> 9  
 tactcaggac tcat 14

35 <210> 10  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> secuencia con SNP

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n es c, o t

50 <400> 10  
 ttganaaag 10

<210> 11  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> artificial

55 <220>  
 <223> Producto de PCR de SEQ ID Nos. 3 y 4 en plantas de floración normal

60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> n es a, c, g, o t

65

ES 2 895 517 T3

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(7)  
 <223> n es a, c, g, o t

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(23)  
 <223> n es a, c, g, o t

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27)..(27)  
 <223> n es a, c, g, o t

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (34)..(34)  
 <223> n es a, c, g, o t

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (40)..(40)  
 <223> n es a, c, g, o t

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (42)..(43)  
 <223> n es a, c, g, o t

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (45)..(45)  
 <223> n es a, c, g, o t

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (83)..(83)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 11

nnngcnnngct cggtcnnncg gnntagncgt gcangggcgn gnntnttcaa gggcagaaga	60
tttgctaggg ttgataaag ctngcaaaac ccttgattgg ctctttacca agtccaagac	120
cgcaattaag gagttggttg aagaaatgaa acacagttca tcttctggtg ctactgatca	180
atgtgaggtt tttcaggaga ccatcatgag gatatcaaat gaaaaagata aaggcgaaaa	240
gaagaagtca gtacccaatg ttcttgaagg aaaaaagaaa aaaactgccc gaaaatataa	300
atctggagtc gatgtgaatc agtcaagggc	330

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Planta de *Osteospermum*, que presenta un fenotipo de flor modificado, en la que al menos una inflorescencia presenta al menos un flósculo discal con una longitud de la corola de flósculo discal de al menos 1,7 cm, en donde la longitud media de la corola de flósculo discal más larga y más corta de al menos una inflorescencia es de al menos 1,45 cm y en donde las anteras están ubicadas en dicha corola de flósculo discal, estando el fenotipo de flor modificado causado por un alelo mutante contenido en la semilla, que ha sido depositada con el número de acceso NCIMB 41698, comprendiendo la planta una secuencia de ADN, que después de la digestión por restricción con EcoRI y MseI y la hibridación de los adaptadores según las SEQ ID Nos. 6 a 9 es una matriz para la amplificación de un fragmento de ADN de aproximadamente 151 nucleótidos con los cebadores según las SEQ ID Nos. 1 y 2.
- 10 2. Planta de *Osteospermum* según la reivindicación 1, en la que la longitud media está comprendida entre 1,45 cm y 1,7 cm.
- 15 3. Planta de *Osteospermum* según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una secuencia de ADN que, tras la amplificación con los cebadores según las SEQ ID Nos. 3 y 4, produce un fragmento que comprende una secuencia TTTGANAAAG (SEQ ID No. 10) en la que N es C.
- 20 4. Célula, semilla o protoplasto producido a partir de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores o un cultivo de tejido de células regenerables producido a partir de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichas células del cultivo de tejido se producen a partir de una parte de la planta seleccionada del grupo que consiste en hoja, polen, embrión, cotiledón, hipocótilo, célula meristemática, protoplasto, raíz, punta de la raíz, pistilo, antera, tallo, pecíolo, flósculo radial y flósculo discal, comprendiendo la célula, la semilla o el protoplasto el alelo mutante de la planta especificada en la reivindicación 1.
- 25 5. Semilla de *Osteospermum* que contiene el alelo mutante de la planta especificada en la reivindicación 1 que es responsable del desarrollo del fenotipo de flor modificado, en la que al menos una inflorescencia presenta al menos una corola de flósculo discal con una longitud de al menos 1,7 cm.
- 30 6. Planta de *Osteospermum*, producida por el cultivo de la semilla de la reivindicación 5.
- 35 7. Cultivo de tejido de células regenerables producidas a partir de la planta de la reivindicación 6, donde dichas células del cultivo de tejido se producen a partir de una parte de la planta seleccionada del grupo que consiste en hoja, polen, embrión, cotiledón, hipocótilo, célula meristemática, protoplasto, raíz, punta de la raíz, pistilo, antera, tallo, pecíolo, flósculo radial y flósculo discal, comprendiendo las células el alelo mutante de la planta especificada en la reivindicación 1.
- 40 8. Planta de *Osteospermum* regenerada a partir de dicho cultivo de tejido de la reivindicación 7.
- 45 9. Planta híbrida intergenérica de *Osteospermum* y *Dimorphoteca*, en la que al menos uno de los progenitores de dicha planta híbrida es la planta *Osteospermum* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y en la que al menos una inflorescencia de la planta híbrida presenta al menos una corola de flósculo discal con una longitud de al menos 1,7 cm, en donde la longitud media de la corola de flósculo discal más larga y más corta de al menos una inflorescencia es de al menos 1,45 cm y en donde las anteras están ubicadas en dicha corola de flósculo discal, estando el fenotipo de flor modificado causado por un mutante alelo de la planta especificada en la reivindicación 1.
- 50 10. Planta híbrida según la reivindicación 9 que se obtiene por fusión de protoplastos de la planta *Osteospermum* según la reivindicación 1 y una planta *Dimorphoteca*.

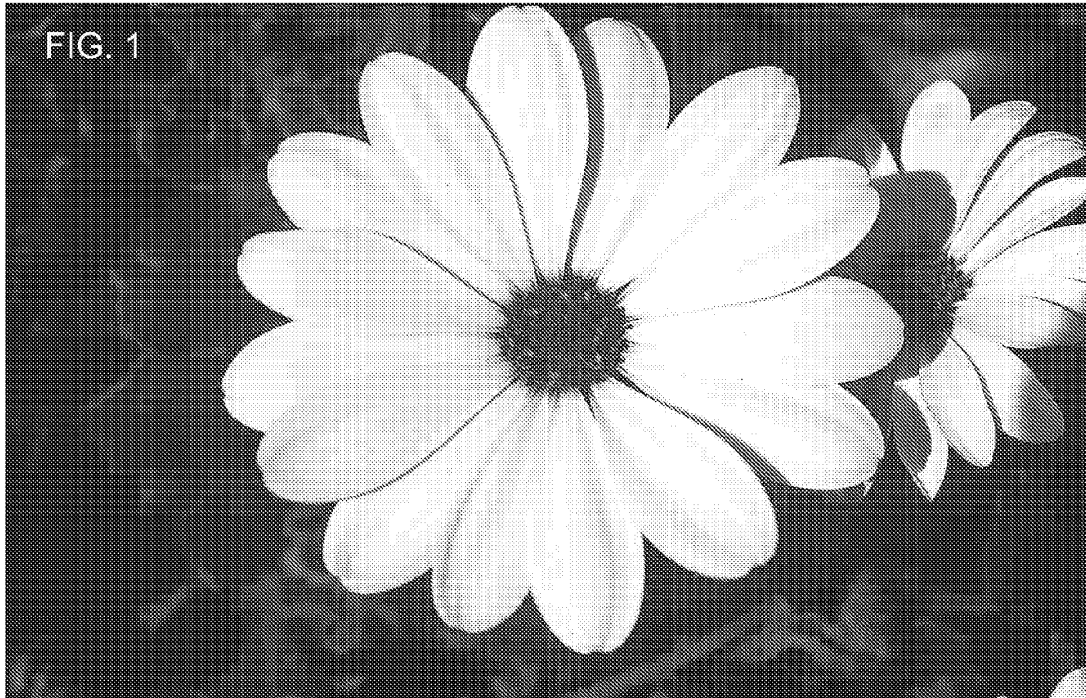






FIG. 4

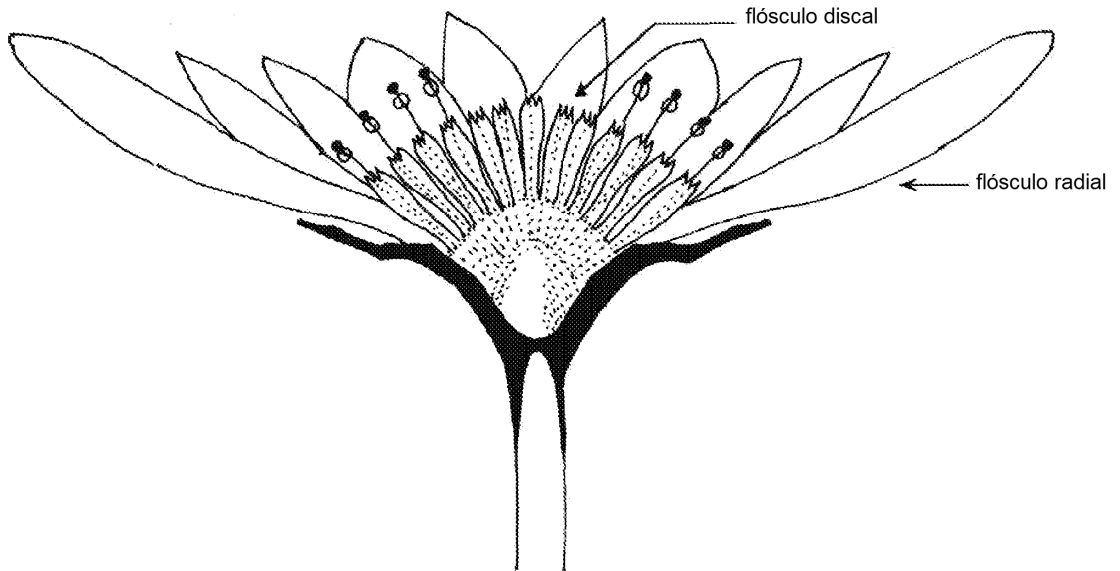


FIG. 5

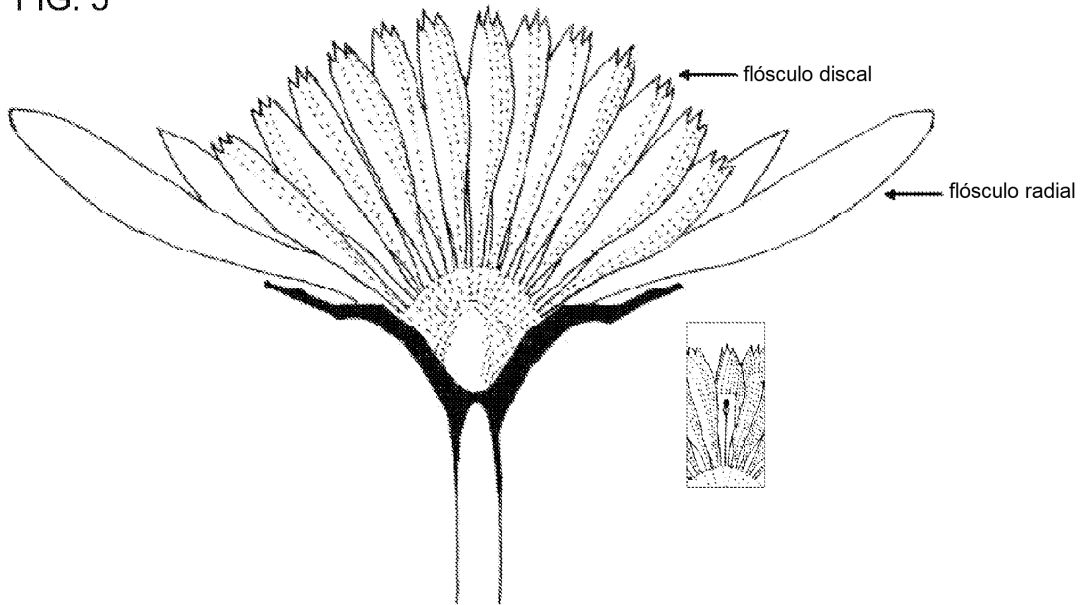
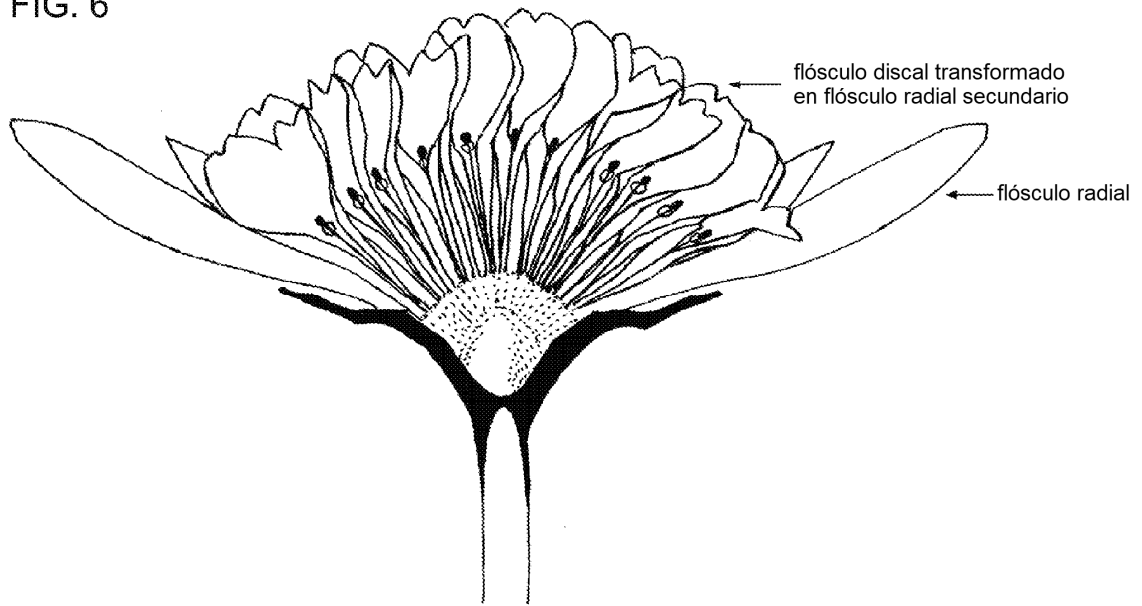


FIG. 6



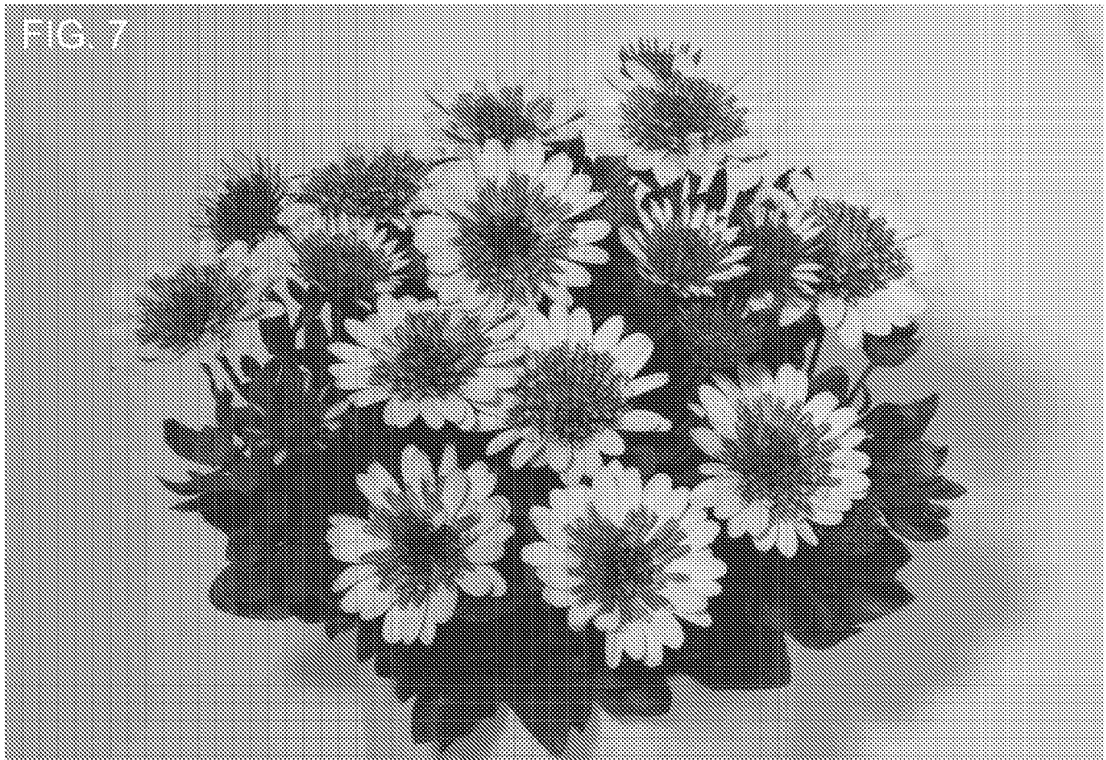


FIG. 8



FIG. 9



FIG. 10

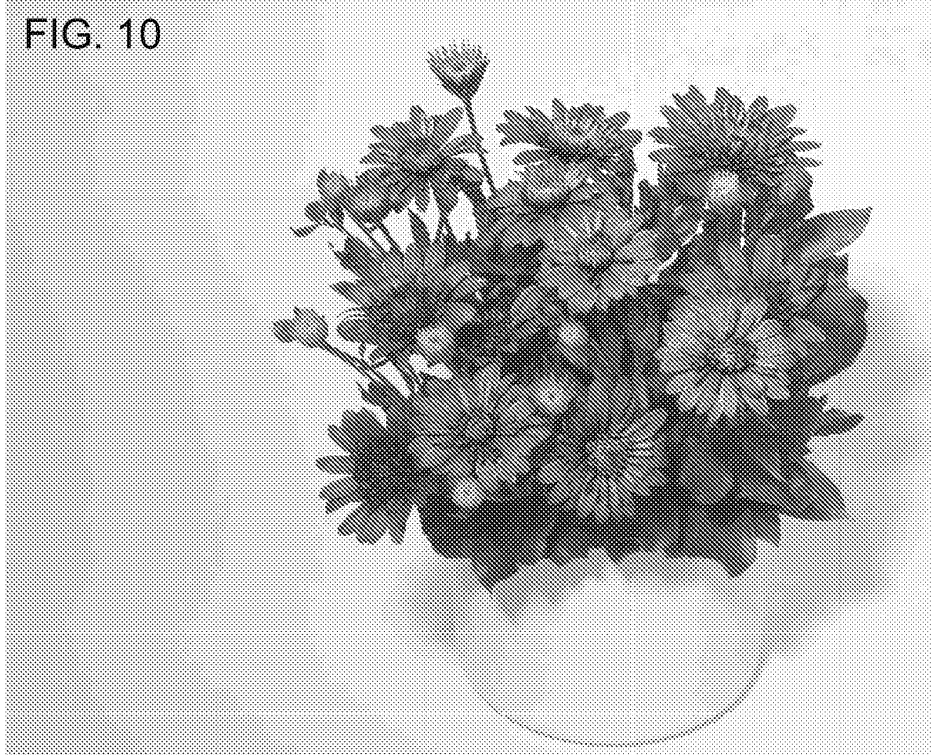
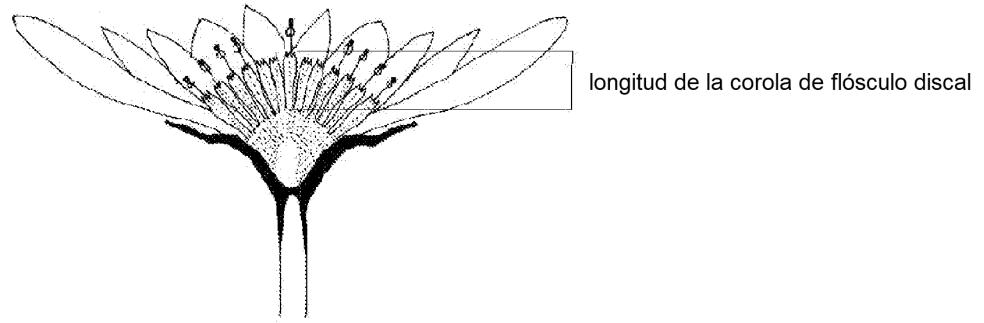


FIG. 11

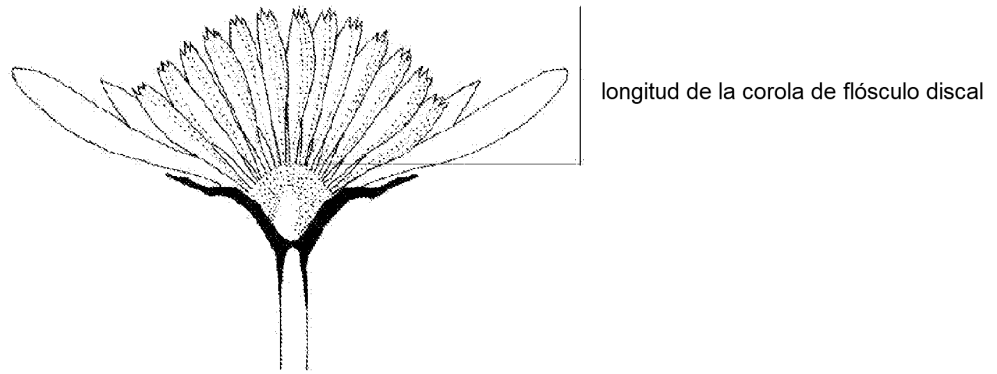


FIG. 12

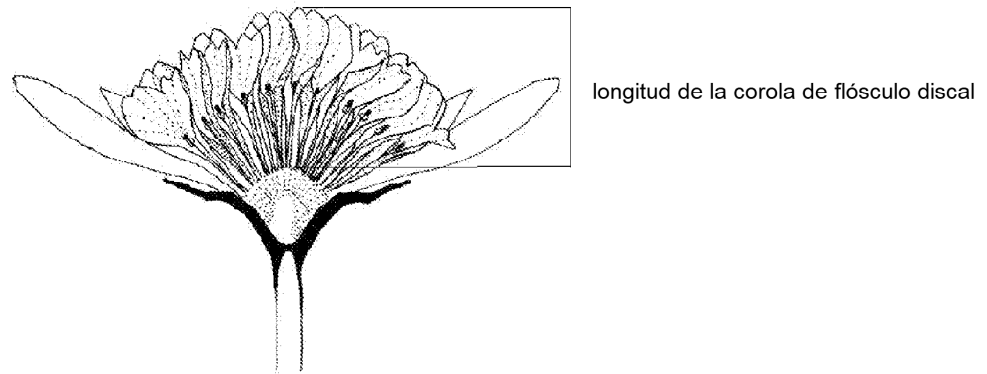




a)



b)



c)

Fig. 13



Fig. 14

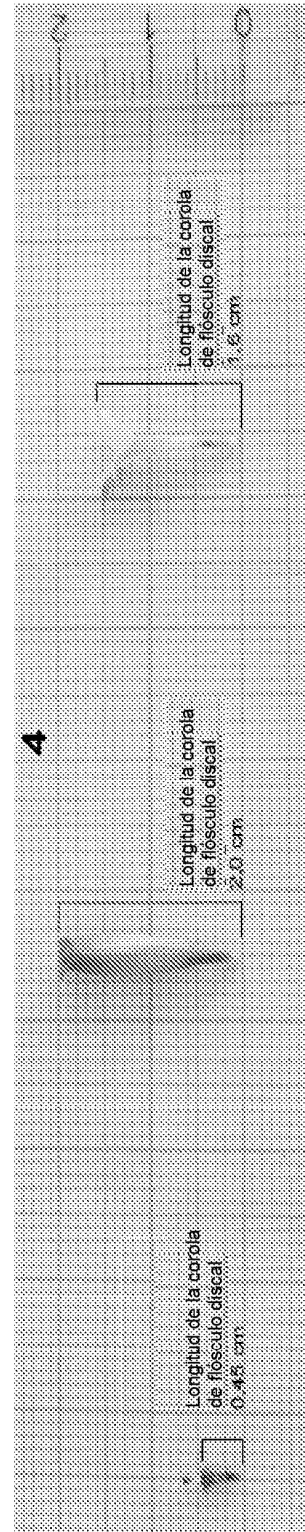


FIG. 15

