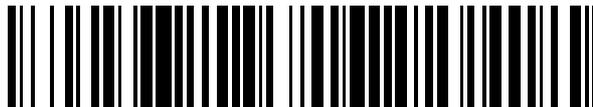


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 175**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04771919 .0**
96 Fecha de presentación: **13.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1652916**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA ROSA CON COLOR MODIFICADO.**

30 Prioridad:
13.08.2003 JP 2003293121
29.06.2004 JP 2004192034

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.12.2011

73 Titular/es:
Suntory Holdings Limited
1-40, Dojimahama 2-chome Kita-ku
Osaka-shi Osaka 530-8203, JP

72 Inventor/es:
TANAKA, Yoshikazu;
FUKUI, Yuko;
TOGAMI, Junichi;
KATSUMOTO, Yukihiya y
MIZUTANI, Masako

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 370 175 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

Proceso para la producción de una rosa con color modificado

Campo Técnico

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para producir una rosa con colores de pétalo alterados. Más específicamente, se refiere a un procedimiento para producir una rosa mediante la inhibición artificial de la vía metabólica endógena de la rosa y la expresión del gen que codifica el flavonoide 3',5'-hidroxilasa del pensamiento y el gen que codifica la dihidroflavonol reductasa, que reduce la dihidromiricetina.

Técnica previa

10 Los pétalos de las flores desempeñan la función de atraer a los polinizadores, como insectos y pájaros que transportan el polen de la planta y, por tanto, los colores, formas, patrones y olores de las flores evolucionaron conjuntamente con los polinizadores (Honda, T. et al., Gendai Kagaku, May, 25-32 (1998)). Probablemente, como resultado de esto, es raro que una única especie de flor presente varios colores diferentes, y por ejemplo, las variedades de rosas o claveles de color violeta a azul no existen, en tanto que tampoco existen las variedades de lirios o gencianas de colores rojos brillantes no existen. Debido a que el color de la flor es el aspecto más importante de los pétalos a los efectos de la apreciación, tradicionalmente las flores de diferentes colores se han cultivado mediante cruzamiento. La rosa, conocida como la "reina de las flores" y con gran valor comercial, también ha sido cruzada en el mundo entero.

15 Por ejemplo, el cultivar de rosa amarilla actual se creó mediante el cruzamiento de la *Rosa foetida*, proveniente de Asia occidental, con una variedad de rosa no amarilla. No obstante, debido a que el color de la flor se determina por la capacidad genética de la planta, se ha alcanzado un límite en los colores de las flores que pueden producirse actualmente en las cepas cruzadas cuyas fuentes genéticas disponibles se encuentran restringidas (Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 39, 1119-1126, 1998; Mol et al. Curr. Opin. Biotechnol. 10, 198-201 1999). Entre estas, se había pensado que el cultivo de rosas azules era imposible y se lo consideró como el "santo grial" de los colores (Oba, H., "Bara no Tanjo", 1997, Chukoshinsho; Suzuki, M., "Shokubutsu Bio no Mahou: Aoi Bara mo Yume dewanakuhatta", 1990, Kodansha Bluebacks; Saisho, H., "Aoi Bara", 2001, Shogakkan).

20 A pesar de que actualmente existen las variedades de "rosas azules", estas son en realidad rosas de color violeta claro. Se cree que la primera variedad mejorada de "rosa azul" mediante cruzamiento es la de color gris con un tono en color violeta claro "Grey Perl" creada en 1945. La rosa de color rosado y violeta claro "Staring Silver" se creó posteriormente en 1957 y estas variedades se cruzaron para producir varias rosas de color violeta claro "Blue Moon" (1964) y "Madam Violet" (1981). Estas rosas de color violeta claro y otras rosas se utilizaron posteriormente en otros cruzamientos para crear las rosas de color gris claro como "Seiryu" (1992) y "Blue Heaven" (2002), que se anunciaron como nuevos tipos de "rosas azules".

25 No obstante, estos colores de flores no son en realidad azules sino meramente rosado grisáceo claro y a pesar de los años de cruzamientos, no existe aún ningún ejemplo de una rosa verdaderamente "azul". En la industria de la horticultura, el grupo de colores de violeta a azul generalmente se considera "azul" de conformidad con la RHSCC (tabla de colores de la Real Sociedad de Horticultura). El objetivo de la presente invención es crear rosales que tengan colores de flores dentro del "grupo violeta", el grupo "violeta-azul" y el "grupo azul" de conformidad con la tabla de colores de la Real Sociedad de Horticultura.

30 Los colores de las flores se derivan principalmente de los tres grupos compuestos de antocianinas, carotenoides y betalainas, pero son las antocianinas, que presentan el mayor intervalo de longitud de onda de absorción (de naranja a azul), las que producen el color azul. Las antocianinas pertenecen a la familia de los flavonoides y se biosintetizan mediante la vía metabólica que se muestra en la figura 1. Normalmente, las antocianinas se ubican en las vacuolas de las células epiteliales. El tono de color de las antocianinas (es decir, el color de la flor) depende en gran medida de la estructura de las antocianinas, con grupos hidroxilo más numerosos en el anillo B que dan como resultado un color más azul. La hidroxilación del anillo B se cataliza mediante el flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) y el flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H). La ausencia de actividad de F3'H y F3'5'H conduce a la síntesis de la pelargonidina (colores de naranja a rojo), la presencia de actividad de F3'H conduce a la síntesis de cianidina (colores rojo a carmín) y la presencia de actividad de F3'5'H conduce a la síntesis de la delfinidina (color violeta).

35 Estas antocianinas se modifican con azúcares y grupos acilo para producir una variedad de antocianinas. En términos generales, un mayor número de grupos acilo aromáticos modificadores se corresponde con las antocianinas más azules. Las antocianinas también producen colores totalmente diferentes en función del pH de la vacuola y los flavonoles copresentes y las flavonas o iones metálicos (Saito, N., Tanpakushitsu Kakusan Kouso, 47 202-209, 2002; Brouillard and Dangles, In the flavonoids: Advances in Research since 1986 (Ed. by Harborne) Capmann and Hall, London pp. 565-588; Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 39 1119-1126, 1998; Mol et al., Trends in Plant Science 3, 212-217, 1998; Mol et al., Curr. Opin. Biotechnol. 10, 198-201 1999).

55 Las antocianinas de los pétalos de la rosa son derivados de la pelargonidina, la cianidina y la peonidina y no se conoce ningún derivado de delfinidina (Biolley and May, J. Experimental Botany, 44, 1725-1734 1993; Mikanagi Y., Saito N.,

Yokoi M. y Tatsuzawa F. (2000) *Biochem. Systematics Ecol.* 28:887-902). Se considera que esta es la principal razón por la que no existen rosas azules. Las rosas existentes han sido creadas mediante el cruzamiento de especies de rosas relacionadas y cruzables (*R. multiflora*, *R. chinensis*, *R. gigantea*, *R. moschata*, *R. gallica*, *R. whichuraiana*, *R. foetida*, etc.).

5 El hecho de que no se haya logrado ninguna rosa azul a pesar de los reiterados esfuerzos en el cruzamiento se atribuye a la falta de capacidad para producir delfinidina por parte de las variedades relacionadas con las rosas. La producción de delfinidina en los pétalos de rosa requeriría la expresión de F3'5'H en los pétalos como se menciona anteriormente, pero se cree que el F3'5'H no se expresa en los pétalos de rosa y variedades relacionadas con la rosa. Por tanto, es prácticamente imposible obtener una rosa azul mediante la acumulación de delfinidina en los pétalos mediante cruzamiento. Se sabe que las cantidades de vestigios de pigmento azul rosacianina se encuentran en los pétalos de rosas y se determinó su estructura química (publicación de patente japonesa sin examinar No. 2002-201372), pero no se conoce ningún informe con respecto al aumento de la rosacianina para crear una rosa azul y no se ha publicado ninguna conclusión acerca de la vía de biosíntesis de la rosacianina o las enzimas o genes pertinentes.

15 Los ejemplos de colores azul o violeta producidos por organismos biológicos también incluyen el color índigo producido por la planta índigo (por ejemplo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Febrero 2003, 60(6):720-5) y la violaceína producida por microbios (*J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* Octubre 2000 2(4):513-9; *Org. Lett.*, Vol. 3, No. 13, 2001, 1981-1984) y se ha estudiado su derivación del triptófano y sus vías biosintéticas.

20 Asimismo se conocen los pigmentos azules basados en los compuestos iridoides derivados del fruto de la gardenia (S. Fujikawa, Y. Fukui, K. Koga, T. Iwashita, H. Komura, K. Nomoto, (1987) "Structure of genipocyanin G1, a spontaneous reaction product between genipin and glycine". *Tetrahedron Lett.* 28 (40), 4699-700; S. Fujikawa, Y. Fukui, K. Koga, J. Kumada, (1987), "Brilliant skyblue pigment formation from gardenia fruits, *J. Ferment. Technol.* 65 (4), 419-24) and lichen-derived azulenes" (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.), pero no se ha informado de que estos se expresen en los pétalos de las flores de las plantas para producir flores de color azul.

25 Se esperaba crear una rosa azul mediante la transferencia del gen F3'5'H expresado por otras plantas a la rosa y la expresión de este en los pétalos de rosa (Saisho, H., "Aoi Bara", 2001, Shogakkan). El gen F3'5'H se obtuvo a partir de varias plantas, entre las que se incluyen la petunia, la genciana y la *Eustoma russellianum* (Holton et al. *Nature* 366, 276-279, 1993; Tanaka et al. *Plant Cell Physiol.* 37, 711-716 1996; WO93/18155). Asimismo, se ha informado de las variedades transformadas de rosa (por ejemplo, Firoozabady et al. *Bio/Technology* 12:883-888 (1994); patente de los Estados Unidos No. 5,480,789; patente de los Estados Unidos No. 5,792,927; EP 536,327 A1; US 20010007157 A1).

30 Asimismo, se informó sobre la transferencia real del gen F3'5'H de petunia a la rosa (WO93/18155, WO94/28140).

No obstante, no ha sido posible obtener una rosa azul y se cree que para obtener una rosa azul se requerirá una modificación que altere el metabolismo de los pigmentos de la flor adecuados para la rosa.

35 Por otra parte, se confirmó que la transferencia del gen F3'5'H al clavel rojo, que produce pelargonidina en lugar de delfinidina, conduce a la acumulación de la pelargonidina y la delfinidina, pero el color de la flor se altera para producir solamente un rojo ligeramente purpúreo (WO94/28140). Este resultado sugiere que no es posible obtener un clavel "azul" simplemente mediante la expresión de F3'5'H y que es necesario inhibir la vía metabólica a la síntesis endógena de la pelargonidina del clavel.

40 Para evitar la competencia con la vía metabólica endógena del clavel (reducción del dihidrocaempferol (DHK) mediante la dihidroflavonol reductasa (DFR)), se seleccionó una variedad que carece de DFR entre los claveles blancos. Se transfirió al clavel el gen F3'5'H y el gen DFR de petunia (que reduce de forma eficaz la dihidromiricetina (DHM) sin reducir el DHK). Esto resultó en un caso de obtención con éxito de un clavel recombinante con un contenido de delfinidina de aproximadamente el 100% y una flor de color azul-violeta que previamente no se encontraba en el clavel (Tanpakushitsu Kakusan Kousho, Vol. 47, No. 3, p 228, 2002). Por tanto, fue necesaria una modificación adicional para obtener una flor de clavel de color azul, además de acumular la delfinidina mediante la expresión del gen F3'5'H.

45 La DFR ya ha sido clonada a partir de varias plantas (petunia, tabaco, rosa, *Torenia*, boca de dragón, margarita de Transvaal, orquídea, cebada, maíz, etc.) (Meyer et al., *Nature* 330, 677-678, 1987; Helariutta et al., *Plant Mol. Biol.* 22, 183-193 1993; Tanaka et al., *Plant Cell Physiol.* 36, 1023-1031; Johnson et al., *Plant J.* 19, 81-85, 1999). La especificidad de sustrato del gen DFR difiere en función de la variedad de planta y se sabe que los genes DFR de la petunia, el tabaco y la orquídea no pueden reducir el DHK, mientras que el gen DFR de la petunia reduce de forma más eficaz la DHM entre los dihidroflavonoles (Forkmann et al., *Z. Naturforsch.* 42c, 1146-1148, 1987; Johnson et al. *Plant J.* 19, 81-85, 1999). No obstante, no se informó sobre ningún caso para la expresión de estos genes DFR en rosas.

55 Como medio para evitar la competencia con la vía metabólica endógena o entre la enzima y la enzima exógena derivada de genes exógenos como el F3'5'H, como se establece anteriormente, el gen puede transferirse a una variedad que carezca del gen. Asimismo, se sabe que la expresión del gen diana puede inhibirse artificialmente mediante procedimientos de eliminación que implican la recombinación homóloga del gen diana, pero debido a la baja frecuencia de la recombinación homóloga y el número limitado de variedades de planta adecuadas, esto no se ha puesto en práctica (por ejemplo, *Nat. Biotechnol.* 2002, 20:1030-4).

Los procedimientos de inhibición del nivel de transcripción incluyen el procedimiento antisentido que utiliza transcripciones de ARN antisentido para el ARNm del gen diana (van der Krol et al., Nature 333, 866-869, 1988), el procedimiento sentido (cosupresión) que utiliza transcripciones de ARN equivalentes al ARNm del gen diana (Napoli et al., Plant Cell 2, 279-289, 1990) y un procedimiento para utilizar transcripciones de ARN bicatenario que corresponden al ARNm del gen diana (procedimiento ARNi; Waterhouse et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13959-13964, 1998).

Se publicaron numerosos ejemplos exitosos de estos tres procedimientos. Para la rosa, se informó que la cosupresión del gen chalcona sintasa (CHS) que es necesario para la síntesis de las antocianinas, altera con éxito el color de la flor de rojo a rosado (Gutterson HortScience 30:964-966 1995), pero esta supresión de CHS es incompleta y por tanto no ha sido posible suprimir de forma total la síntesis de antocianina para obtener una cepa de flor blanca.

- 10
 - Documento de patente 1: Publicación de patente japonesa sin examinar No. 2002-201372
 - Documento de patente 2: WO93/18155
 - Documento de patente 3: Patente de los Estados Unidos No. 5,480,789
 - Documento de patente 4: Patente de los Estados Unidos No. 5,792,927
 - Documento de patente 5: Patente europea 536 327 A1
- 15
 - Documento de patente 6: US 20010007157 A1
 - Documento de patente 7: WO94/28140
 - Documento que no es una patente 1: Honda T. et al. Gendai Kagaku, May, 25-32 (1998)
 - Documento que no es una patente 2: Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 39, 1119-1126, 1998
 - Documento que no es una patente 3: Mol et al. Curr. Opinion Biotechnol. 10, 198-201 1999
- 20
 - Documento que no es una patente 4: Oba, H., "Bara no Tanjo", 1997, Chukoshinsho
 - Documento que no es una patente 5: Suzuki, M., "Shokubutsu Bio no Mahou: Aoi Bara mo Yume dewanakunatta", 1990, Kodansha Bluebacks
 - Documento que no es una patente 6: Saisho, H., "Aoi Bara", 2001, Shogakkan
 - Documento que no es una patente 7: Saito, N., Tanpakushitsu Kakusan Kouso, 47 202-209, 2002
- 25
 - Documento que no es una patente 8: Brouillard et al. In the flavonoids: Advances in Research since 1986 (Ed por Harborne) Capmann y Hall, London pp 565-588
 - Documento que no es una patente 9: Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 39 1119-1126, 1998
 - Documento que no es una patente 10: Mol et al, Trends in Plant Science 3, 212-217 1998
 - Documento que no es una patente 11: Mol et al. Curr. Opinion Biotechnol. 10, 198-201 1999
- 30
 - Documento que no es una patente 12: Biolley y May, J. Experimental Botany, 44, 1725-1734 1993
 - Documento que no es una patente 13: Mikanagi Y, et al. (2000) Biochem Systematics Ecol. 28:887-902
 - Documento que no es una patente 14: Appl. Microbiol. Biotechnol. Febrero de 2003; 60(6):720-5
 - Documento que no es una patente 15: J. Mol. Microbiol. Biotechnol. Octubre de 2000; 2 (4): 513-9
 - Documento que no es una patente 16: Org. Lett., Vol. 3, No. 13, 2001, 1981-1984
- 35
 - Documento que no es una patente 17: S. Fujikawa, et al. (1987) Tetrahedron Lett. 28 (40), 4699-700
 - Documento que no es una patente 18: S. Fujikawa, et al. (1987) J. Ferment. Technol. 65 (4), 419-24
 - Documento que no es una patente 19: Holton et al. Nature 366, 276-279, 1993
 - Documento que no es una patente 20: Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 37, 711-716 1996

- Documento que no es una patente 21: Firoozababy et al. Bio/Technology 12:883-888 (1994)
- Documento que no es una patente 22: Tanpakushitsu Kakusan Kousho, Vol. 47, No. 3, p 228, 2002
- Documento que no es una patente 23: Meyer et al. Nature 330, 677-678, 1987
- Documento que no es una patente 24: Helariutta et al. Plant Mol. Biol. 22 183-193 1993
- 5 • Documento que no es una patente 25: Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031
- Documento que no es una patente 26: Johnson et al. Plant J. 19, 81-85, 1999
- Documento que no es patente 27: Forkmann et al. Z. Naturforsch. 42c, 1146-1148, 1987
- Documento que no es una patente 28: Nat Biotechnol 2002, 20:1030-4
- Documento que no es una patente 29: van der Krol et al. Nature 333, 866-869, 1988
- 10 • Documento que no es una patente 30: Napoli et al. Plant Cell 2, 279-289, 1990
- Documento que no es una patente 31: Waterhouse et al. Pro. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13959-13964 1998
- Documento que no es una patente 32: Gutterson HortScience 30:964-966 1995
- Documento que no es una patente 33: Suzuki, S., "Bara, Hanazufu", Shogakkann, p. 256-260, 1990

Divulgación de la invención

15 Como se menciona anteriormente, los colores de la rosa se alteraron con éxito mediante la transferencia del gen F3'5'H a la rosa y la expresión de este en los pétalos. En el clavel, el gen F3'5'H y el gen DFR de la petunia se expresaron en las variedades con deficiencia de DFR para crear claveles de color azul-violeta. No obstante, aún no se ha creado la "rosa azul". Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un rosal que florezca con una flor azul.

20 La invención proporciona por tanto (1) un procedimiento para producir una rosa caracterizada por la supresión artificial de la vía metabólica endógena de la rosa y la expresión del gen del pensamiento que codifica flavonoide 3',5'-hidroxilasa.

La invención proporciona además (2) un procedimiento para producir una rosa caracterizada por la supresión artificial de la vía metabólica endógena de la rosa y la expresión del gen del pensamiento que codifica el flavonoide 3',5'-hidroxilasa y el gen que codifica la dihidroflavonol reductasa.

25 Asimismo la invención también proporciona (3) un procedimiento para producir una rosa caracterizada por la supresión artificial de la dihidroflavonol reductasa endógena de la rosa y la expresión del gen del pensamiento que codifica el flavonoide 3',5'-hidroxilasa y el gen que codifica la dihidroflavonol reductasa derivada de una planta que no es un rosal.

Asimismo la invención también proporciona (4) un procedimiento para producir una rosa caracterizada por la supresión artificial de la expresión del flavonoide 3-hidroxilasa endógeno de la rosa y la expresión del gen del pensamiento que codifica el flavonoide 3',5'-hidroxilasa.

30 El gen del pensamiento mencionado anteriormente que codifica el flavonoide 3'5' -hidroxilasa es, por ejemplo, el gen que se enumera en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. El gen que codifica la dihidroflavonol reductasa se deriva preferentemente de lirio, *Nierembergia*, petunia, orquídea, genciana o *Eustoma russellianum*.

35 Asimismo la invención también proporciona (5) una rosa obtenida mediante el procedimiento de producción de conformidad con cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores o su progenie o tejido que tiene las mismas propiedades que la rosa.

Asimismo la invención también proporciona (6) una rosa obtenida mediante el procedimiento de producción de conformidad con cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores o su progenie o tejido donde el color del pétalo de la rosa es violeta.

40 La invención proporciona además (7) una rosa de conformidad con el punto (6) anterior o su progenie o tejido, donde el color del pétalo de la rosa pertenece al "grupo violeta" de conformidad con la tabla de colores de la Real Sociedad de Horticultura (RHSCC).

La invención proporciona además (8) una rosa de conformidad con el punto (7) anterior o su progenie o tejido, donde el color del pétalo de la rosa pertenece al "grupo violeta" 85a u 85b de conformidad con la tabla de colores de la Real Sociedad de Horticultura (RHSCC).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la vía de biosíntesis del flavonoide.

CHS: Chalcona sintasa, CHI: Chalcona isomerasa, FNS: Flavona sintasa, F3H: Flavanona 3-hidroxilasa

F3'H: Flavonoide 3'-hidroxilasa

5 F3'5'H: Flavonoide 3'5'-hidroxilasa, FLS: Flavonol sintasa

DFR: Dihydroflavonol 4-reductasa

ANS: Antocianidina sintasa, AS: Aurona sintasa C2'GT: Chalcona 2'-glucosil transferasa.

La figura 2 muestra la estructura del plásmido pBERD1.

La figura 3 muestra la estructura del plásmido pBPDBP2.

10 La figura 4 muestra la estructura del plásmido pBPDBP8.

La figura 5 muestra la estructura del plásmido pSPB461.

La figura 6 muestra la estructura del plásmido pSPB472.

La figura 7 muestra la estructura del plásmido pSPB130.

La figura 8 muestra la estructura del plásmido pSPB919.

15 La figura 9 muestra la estructura del plásmido pSPB920.

La figura 10 muestra la estructura del plásmido pSPB1106.

Modo más adecuado para realizar la invención

Pueden enumerarse varias razones para explicar la falta del color azul en la rosa incluso con la producción de delfinidina. La estabilidad, solubilidad y color de las antocianinas varían en función de la modificación con grupos acilo y los azúcares. Específicamente, se sabe que el aumento en el número de grupos acilo aromáticos resulta en más color azul. Asimismo, la formación de complejos entre los copigmentos y antocianinas de flavonol y flavona produce un color azul y cambia el alcance máximo de longitud de onda de absorción hacia el extremo de la longitud de onda más larga, al tiempo que aumenta la absorbancia. El color de la antocianina también depende del pH. Debido a que el pH más bajo tiende al color rojo y el pH más neutral produce un color azul, el color de la flor depende del pH de las vacuolas en las cuales se encuentran las antocianinas. Asimismo, la formación de quelados metálicos en copresencia de iones metálicos como el Al^{3+} y Mg^{2+} puede también afectar de forma significativa el color de la flor. El ensayo y error y la investigación diligente condujeron a la propuesta de una modificación por la cual se aumenta la proporción de delfinidina en los pétalos de la flor.

20 En primer lugar, se intentó crear una rosa azul mediante el mismo procedimiento utilizado para crear un clavel azul-violeta. Específicamente, se intentó analizar la variedad de rosa blanca 112 e identificar una línea con deficiencia de DFR pero, a diferencia del clavel, no se pudo obtener ninguna línea con deficiencia completa de DFR. Esto puede ser debido al hecho de que el clavel es diploide mientras que la rosa cultivada de forma ordinaria es tetraploide, por lo que es difícil encontrar una línea que sea deficiente en un solo gen.

35 A continuación, el gen F3'H del pensamiento y el gen de la DFR de la petunia se transfirieron a la variedad de flor blanca Tineke y se detectó la acumulación de delfinidina, pero la cantidad fue mínima y no se obtuvo una rosa azul.

40 De conformidad con la presente invención, el gen DFR, una enzima que participa en la vía de síntesis flavonoide endógena de la rosa, se suprime artificialmente mediante una técnica de ingeniería genética y el gen F3'5'H del pensamiento se expresa al tiempo que también se expresa un gen de DFR que reduce la dihidromiricetina, para aumentar el contenido de delfinidina a aproximadamente el 80-100% del total de antocianinas en los pétalos de la flor, lo que de ese modo permite la realización de una rosa azul.

45 Los genes DFR que reducen la dihidromiricetina utilizados en este caso fueron derivados de lirio (Iridaceae), *Nierembergia* (Solanaceae) y petunia (Solanaceae), pero como otras fuentes de genes DFR que reducen la dihidromiricetina pueden mencionarse las plantas que no acumulan pelargonidina como la del tabaco (Solanaceae), ciclamen (Primulaceae), espuela de caballero (Ranunculaceae), orquídea (Orchidaceae), gentiana (Gentianaceae), *Eustoma russellianum* (Gentianaceae) y similares (Forkmann 1991, Plant Breeding 106, 1-26; Johnson et al., Plant J. 1999, 19, 81-85). Los genes DFR utilizados para la presente invención son genes que reducen preferentemente la dihidromiricetina.

De conformidad con la presente invención, el gen flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H), una enzima que participa en la vía de síntesis flavonoide endógena de la rosa, se suprime artificialmente mediante una técnica de ingeniería genética y el gen F3'5'H del pensamiento se expresa para aumentar el contenido de delfinidina a aproximadamente el 80-100% del total de antocianidinas en los pétalos de la flor, lo que de ese modo permite la realización de una rosa azul.

- 5 Las rosas obtenidas de conformidad con la invención presentan colores de flor inexistentes hasta el momento y la invención puede proporcionar rosas con colores de flor que pertenecen no solamente al grupo de rojo-púrpura, grupo púrpura y grupo púrpura-violeta sino también al grupo violeta de conformidad con la tabla de colores de la Real Sociedad de Horticultura.

Ejemplos

- 10 A continuación, la presente invención se explicará en mayor detalle mediante los siguientes ejemplos. A menos que se especifique de otro modo, los protocolos biológicos moleculares utilizados se basaron en la clonación molecular (Sambrook and Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Ejemplo 1. Procedimiento de medición del color de la flor

- 15 El tono de color del pétalo de la flor se evaluó por medición mediante el uso de un colorímetro espectrofotométrico (Minolta Japón) con un campo visual de 10° y una fuente de luz D65 y análisis mediante el uso de un software de control del color SpectraMagic (Minolta Japón). El número de la tabla de colores de la Real Sociedad de Horticultura (RHSCC) es el color más cercano en comparación con el Sistema de Clasificación de Colores 2.1.1 (The Japan Research Institute Co., Ltd.; publicación de patente japonesa sin examinar No. 2002-016935), basado en el valor del color (sistema de colores CIE L*a*b*) obtenido mediante discriminación visual y medición con el dispositivo mencionado anteriormente.
- 20 Este sistema puede utilizarse para la selección objetiva del número de la RHSCC más cercano.

- Tras la medición de los tonos de colores de los pétalos de la flor de los cultivares que se denominan "rosas azules" y la determinación de los colores más cercanos de conformidad con la RHSCC mediante este procedimiento, se determinó que los colores "Blue Moon" y "Madam Violet" eran 186d (grupo púrpura grisáceo), Lavande era 186c (grupo púrpura grisáceo), Seiryu era 189d (grupo verde grisáceo) y "Blue Heaven" era 198d (grupo verde grisáceo). Estas cultivares se
- 25 denominan rosas azules pero se clasifican en grupos de "Gris" de conformidad con el número de la RHSCC y por lo tanto no presentan el color azul que es objeto de la presente invención.

Ejemplo 2. Análisis de flavonoides

1) Extracción del color del pétalo de la flor

- Una porción de 0,5 g de pétalos de rosa liofilizados se sometió a la extracción en 4 ml de acetonitrilo al 50% (CH₃CN) que contenía TFA al 0,1 % durante 20 minutos bajo vibración ultrasónica y después se filtró con un filtro de 0,45 μm. Se
- 30 realizó cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de las antocianinas en el extracto en las siguientes condiciones. Se llevó a cabo la elución isocrática mediante el uso de una columna RSpak DE-413L (4,6 mmφ×25 cm, Shoko Co., Ltd.) con una velocidad de flujo de 0,6 ml/min y una fase móvil a un gradiente de concentración lineal de CH₃CN/H₂O al 10%→50% que contenía ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5% durante 15 minutos seguida de CH₃CN/H₂O al 50% que
- 35 contenía TFA al 0,5% durante 10 minutos. La detección se realizó mediante el uso de un detector de haz de fotodiodos SPD-M10A (Laboratorios Shimadzu), con detección en el intervalo de longitud de onda de 600-250 nm y un cálculo de la proporción de abundancia de cada antocianina basada en el área de absorbancia de 520 nm.

2) Análisis de antocianidinas

- Una porción de 0,2 ml del filtrado se secó completamente a presión reducida en un tubo de ensayo de vidrio y se disolvió en 0,2 ml de ácido clorhídrico (HCl) 6N y se sometió a hidrólisis a 100°C durante 20 minutos. Las antocianidinas hidrolizadas se extrajeron con 0,2 ml de 1-pentanol y la capa orgánica se analizó mediante HPLC en las siguientes
- 40 condiciones. La columna utilizada fue ODS-A312 (6 mmφ×15 cm, YMC Co., Ltd.) y la elución se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 1 ml/min mediante el uso de una solución de CH₃COOH:CH₃OH:H₂O=15:20:65 como la fase móvil.

- La detección se realizó mediante medición espectral a 600-400 nm mediante el uso de un detector de haz de fotodiodos SPD-M10A (Laboratorios Shimadzu), la identificación basada en la absorción máxima (λ_{máx}) y el tiempo de retención (RT) y cuantificación basada en un área de absorbancia de 520 nm. El tiempo de retención (λ_{máx}) de la delfinidina y la
- 45 cianidina en estas condiciones de HPLC fue de 4,0 min, 5,2 min y 534 nm, 525 nm, respectivamente. El hidrocloreuro de delfinidina y el hidrocloreuro de cianidina comprados a Funakoshi Co., Ltd. se utilizaron como muestras para la identificación y cuantificación.

3) Análisis de flavonoles

Una porción de 0,2 ml del filtrado extraído de los pétalos de la flor se secó hasta endurecerse a presión reducida en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se disolvió en 0,2 ml de una solución amortiguadora de fosfato de potasio (KPB) 0,1 M a un pH de 4,5 y después se agregaron 6 unidades de α-glucosidasa (Shinnihon Kagaku Co., Ltd.) y una unidad de naringenasa (Sigma Chemical Co., MO, USA) y la mezcla se mantuvo a 30°C durante 16 horas. Después de la reacción,

se agregaron 0,2 ml de CH₃CN al 90% a la solución de reacción enzimática para finalizar la reacción. La solución se filtró con un filtro de 0,45 µm y se sometió a HPLC en las siguientes condiciones.

5 La elución isocrática se llevó a cabo mediante el uso de una columna de Develosil C30-UG-5 (4,6 mmφ×15 cm, Nomura Chemical Co., Ltd.) con una velocidad de flujo de 0,6 ml/min y una fase móvil a un gradiente de concentración lineal de CH₃CN/H₂O al 18%→63% que contenía TFA al 0,1% durante 10 minutos seguido de CH₃CN/H₂O al 63% que contenía TFA al 0,1% durante 10 minutos. La detección se realizó mediante el uso de un detector de haz de fotodiodos SPD-M10A, con detección en el intervalo de longitud de onda de 400-250 nm. El tiempo de retención y λ_{máx} del kaempferol y la quercetina en estas condiciones fue de 11,6 min, 365 nm y 10,3 min, 370 nm, respectivamente. El kaempferol y la quercetina comprados a Funakoshi Co., Ltd. se utilizaron como muestras para la cuantificación basada en el área A330 nm.

Ejemplo 3. Procedimiento de medición del pH

Aproximadamente 2g de pétalos de rosa congelados a -80°C durante una hora o más se prensaron con un homogenizador para obtener el jugo de pétalos. El pH se midió mediante la conexión de un microelectrodo 6069-10C (Laboratorios Horiba) a un medidor de pH (F-22, Horiba Laboratories).

15 Ejemplo 4. Transformación de la rosa

Se informó acerca de varios procedimientos para la transformación de rosas (por ejemplo, Firoozababy et al. Bio/Technology 12:883-888 (1994); Patente de los Estados Unidos No. 5,480,789; patente de los Estados Unidos No. 5,792,927; patente europea 536.327 A1; US 20010007157 A1), y la transformación puede llevarse a cabo mediante cualquiera de estas técnicas. Específicamente, se sumergieron los callos de la rosa tomados de las hojas asépticas de plántula durante 5 minutos en una suspensión bacteriana de *Agrobacterium tumefaciens* Ag10 (Lazo et al., Bio/Technology 9:963-967, 1991), el exceso de suspensión bacteriana se extrajo con papel de filtro estéril y los callos se transfirieron a un medio de subcultivo y se cocultivaron durante 2 días en un cuarto oscuro.

25 Después de enjuagar posteriormente con un medio líquido de MS que contenía 400 mg/L de carbenicilina, los callos se transfirieron a un medio de selección/eliminación preparado mediante la adición de 50 mg/L de kanamicina y 200 mg/L de carbenicilina a un medio de subcultivo. Después de repetir la transferencia y cultivo de las porciones que crecieron normalmente en el medio de selección sin inhibición de crecimiento, se seleccionaron los callos resistentes a la kanamicina. Los callos transformados resistentes a la kanamicina se cultivaron en un medio de rediferenciación que contenía 50 mg/L de kanamicina y 200 mg/L de carbenicilina para obtener brotes resistentes a la kanamicina. Los brotes obtenidos se enraizaron en un medio 1/2MS y después se acondicionaron. Las plantas acondicionadas se colocaron en macetas y luego se cultivaron en un invernadero cerrado hasta florecer.

30 Ejemplo 5. Obtención del gen flavonoide de la rosa

La biblioteca de ADNc derivada de los pétalos de la flor de la variedad de rosa Kardinal se detectó mediante el uso del gen DFR de la petunia (descrito en WO96/36716) como sonda, para obtener el ADNc de DFR de la rosa que se denominó pCGP645. Los detalles se describieron (Tanaka et al., Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031 1995).

35 De igual modo, la misma biblioteca se detectó con el gen chalcona sintasa-A (CHS-A) de la petunia (Koes et al., Gene (1989) 81, 245-257) y el gen antocianidina sintasa (ANS) (Martin et al., Plant J., (1991) 1, 37-49) de conformidad con un procedimiento conocido públicamente (Tanaka et al., Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031 1995), para obtener los homólogos de la chalcona sintasa (CHS) y antocianidina sintasa (ANS) de la rosa que fueron denominados como pCGP634 y pCGP1375, respectivamente. La secuencia de nucleótidos para la CHS de la rosa se enumera como la SEQ ID NO: 5 y la secuencia de nucleótidos para la ANS de la rosa se enumera como la SEQ ID NO: 6.

40 Ejemplo 6. Detección de la rosa blanca

Para la creación de un cultivar azul mediante la recombinación de genes, pueden seleccionarse los cultivares que carecen únicamente del gen DFR para evitar la competición entre la vía de síntesis endógena de la antocianina y los genes introducidos (especialmente el gen F3'5'H) y el gen DFR de la petunia y el gen F3'5'H transferidos a sus cultivares (WO96/36716).

Se realizó una selección entre las numerosas variedades existentes de rosas blancas para detectar aquellas que únicamente carecían del gen DFR y que expresaban normalmente otros genes enzimáticos de biosíntesis de antocianinas. Se cree que la causa del blanqueamiento del color de la flor es una mutación ocasional o eliminación de los genes estructurales implicados en la biosíntesis de antocianinas y la pérdida ocasional de factores que regulan la transcripción de los genes estructurales que participan en la biosíntesis de antocianina. Se examinaron las rosas que carecían del ARNm del gen DFR de conformidad con el procedimiento descrito en WO96/36716.

55 En primer lugar, se analizaron 112 líneas de rosas principalmente blancas para detectar la composición flavonoide de los pétalos de la flor mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1 y se seleccionaron las líneas con una alta acumulación de flavonoles. El pH de cada jugo de pétalo después se midió y se escogieron 80 cultivares con un pH relativamente alto como principales candidatas.

A continuación se extrajo el ARN de los pétalos de estos cultivares. La extracción de ARN se logró mediante un procedimiento conocido públicamente (Tanaka et al., Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031, 1995). El ARN obtenido se utilizó para examinar la presencia o ausencia de ARNm que corresponde al gen DFR de la rosa (Tanaka et al., Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031, 1995) y al gen antocianidina sintasa (ANS) de la rosa. Se llevó a cabo la RT-PCR y se seleccionaron ocho cultivares (WKS-11, 13, 22, 36, 43, White Killarney, Tsuru No. 2, Tineke) que tenían una expresión endógena baja de ARNm de DFR y niveles normales de ARNm de ANS.

La RT-PCR se llevó a cabo con un Sistema Script de Síntesis de Primera hebra para RT-PCR (Invitrogen) mediante el uso del ARN obtenido de los pétalos de cada cultivar. Se detectó el ARNm de DFR mediante el uso de cebadores de DFR-2F (5'-CAAGCAATGGCATCGGAATC-3') (SEQ ID NO: 13) y DFR-2B (5'-TTTCCAGTGAGTGCGAAAGTC-3') (SEQ ID NO: 14) y el ARNm de la ANS se detectó mediante el uso de cebadores de ANS-2F (5'-TGGACTCGAAGAACTCGTCC-3') (SEQ ID NO: 15) y ANS-2B (5'-CCTCACCTTCTCCCTTGTT-3') (SEQ ID NO: 16).

Estos ocho cultivares mostraron niveles bajos de ARNm de DFR y niveles normales de ARNm de ANS en la inmunotransferencia Northern blotting (Tabla 1) y sus propiedades de cultivo fueron excelentes. Se eligieron dos de los cultivares transformables (Tineke, WKS36) para la transferencia real de la construcción que produce delphinidina.

TABLA 1

Nombre del cultivar	Flavonoles (mg/g de pétalo)			pH	RT-PCR		
	Q	K	Total		DFR	CHS	ANS
WKS-36	0,082	8,095	8,177	4,81	-	+	+
Killarney blanca	1,343	6,113	7,456	4,7	+	+	+
Tsuru No. 2	0,715	5,188	5,903	4,7	+	+	+
WKS-11	2,028	0,475	2,503	4,51	+	+	
Tineke	0,097	4,337	4,434	4,45	-	+	+
WKS-13	0,320	3,993	4,313	4,45	-	+	+
WKS-22	0,145	10,469	10,614	4,41	-	+	+
WKS-43	0,045	2,104	2,149	4,07	-	+	+

+: ARNm detectado en el mismo nivel que la rosa de color (cultivar Rote Rose)
 -: ARNm detectado en niveles más bajos que la rosa de color (cultivar Rote Rose)
 Q: Quercetina, K: kaempferol

Ejemplo 7. Transferencia del gen DFR a la rosa a Tineke

El plásmido pE2113 (Mitsuhara et al., Plant Cell Physiol. 37, 45-59, 1996) comprende el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (E1235S) que contiene repetición de la secuencia promotora y el terminador de la nopalina sintasa. Este plásmido se digirió con SacI y los extremos se cortaron mediante el uso de un kit de corte (Takara). El fragmento de ADN se ligó con un ligador Sall (Takara) 8 bp y el plásmido obtenido se denominó pUE5.

El plásmido pUE5 se digirió con HindIII y EcoRI para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 3 kb, el cual se introdujo en el pBin19 (Bevan M., Binary Agrobacterium Vector for plant transformation. Nucl. Acid Res. 12, 8711-21, 1984) anteriormente digerido con HindIII y EcoRI, para obtener el plásmido pBE5. A continuación, el pCGP645 se digirió con BamHI y XhoI para obtener un fragmento de ADN que contiene ADNc de DFR de rosa de longitud completa. Este se ligó con pBE5 digerido con BamHI y XhoI para construir pBERD1 (FIG. 2). El plásmido se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* Ag10.

El plásmido pBERD1 (FIG. 2) se transfirió al cultivar de rosa blanca "Tineke" y se obtuvieron 18 transformantes. El color de la flor se alteró en seis de los transformantes obtenidos. El análisis de pigmentos de dos plantas en las cuales se observó un claro cambio de color de blanco a rosado confirmó la acumulación de cianidina y pelargonidina en ambas (Tabla 2). Estos resultados sugirieron que el cultivar Tineke es un cultivar que carece del gen DFR.

TABLA 2

No. de planta	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)
1	0,014	0,005
2	0,014	0,006

Cia: Cianidina, Pel: Pelargonidina

Ejemplo 8. Transferencia del gen F3'5'H (#18) del pensamiento y el gen DFR de la petunia a Tineke

Se extrajo el ARN de los pétalos del pensamiento en ciernes (variedad de pensamiento negro) mediante el procedimiento de Turpen y Griffith (BioTechniques 4:11-15, 1986) y se utilizó Oligotex-dT (Qiagen) para la purificación del poliA⁺ARN. Se utilizó este poliA⁺ARN y un kit de clonación λZAPII/GigapackII (Stratagene) para construir una biblioteca de ADNc a partir de los pétalos del pensamiento en ciernes. Después de transferir aproximadamente 100.000 pfu de las placas de fagos cultivadas en una placa NZY a una Colony/PlaqueScreen (DuPont), el tratamiento se llevó a cabo según el protocolo recomendado por el fabricante. Las placas se marcaron con ³²P y se tamizaron mediante el uso de Hf1ADNc de petunia Hf1DNAc (pCGP602, Holton et al., Nature, 366, p 276-279, 1993) como sonda.

La membrana se sometió a pre-hibridación durante 1 hora a 42°C en una solución amortiguadora de hibridación (formamida al 10% (v/v), NaCl 1 M, sulfato de dextrano al 10% (p/v), SDS al 1%), y luego la sonda marcada con ³²P se agregó a 1×10⁶ cpm/ml y la hibridación se llevó a cabo durante 16 horas a 42°C. Se lavó la membrana durante 1 hora en 2×SSC, SDS al 1% a 42°C, se intercambió la solución de lavado fresca y se lavó nuevamente durante 1 hora. La membrana lavada se expuso en una película Kodak XAR junto con una pantalla intensificadora y se detectó la señal de hibridación.

Los resultados del análisis de ADNc demostraron que los dos ADNc obtenidos presentaban una alta identidad con el Hf1 de petunia. Los dos tipos de ADNc se denominaron ADNc Hf1 del pensamiento BP#18 (pCGP1959) y BP#40 (pCGP1961). La secuencia de nucleótidos para #18 se enumera como la SEQ ID NO: 1 y su secuencia de aminoácidos correspondiente se enumera como la SEQ ID NO: 2, la secuencia de nucleótidos para #40 se enumera como la SEQ ID No. 3 y su secuencia de aminoácidos correspondiente se enumera como la SEQ ID NO: 4. El BP#18 y BP#40 tienen un 82% de identidad en el nivel de ADN. Asimismo, tanto el BP#18 como el BP#40 presentan un 60% de identidad con el Hf1 de petunia y un 62% de identidad con el Hf2 de petunia (Holton et al., Nature, 366, p 276-279, 1993) en el nivel de ADN.

Por otra parte, el plásmido pUE5 se digirió con EcoRI y los extremos se cortaron mediante el uso de un kit de corte (Takara) y el fragmento de ADN obtenido se ligó con un ligador HindIII 8 bp (Takara), lo que produjo un plásmido que se denominó pUE5H. Se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kb obtenido mediante digestión completa del plásmido pCGP1959 que contenía ADNc F3'5'H #18 del pensamiento con BamHI y a digestión parcial con XhoI. El plásmido obtenido mediante enlace de este pUE5H digerido con BamHI y XhoI se denominó pUEBP18.

Por otra parte, se recuperó un fragmento de ADN que contenía ADNc de DFR de petunia mediante la digestión de pCGP1403 (WO96/36716) con BamHI y XhoI y este fragmento de ADN se ligó con el pBE5 que había sido digerido con BamHI y XhoI para preparar pBEPD2. A continuación, el pUEBP18 se digirió parcialmente con HindIII y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,8 kb que contenía el promotor E1235S, el ADNc F3'5'H #18 del pensamiento y el terminador nos. Este fragmento se ligó con un fragmento de ADN obtenido mediante digestión parcial de pBEPD2 con HindIII para obtener un plásmido de vector binario pBPDBP2 (FIG. 3). El plásmido se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* Ag10.

El plásmido pBPDBP2 (FIG. 3) se transfirió al cultivar de rosa blanca "Tineke" y se obtuvieron 40 transformantes. El color de la flor se alteró en 23 de los transformantes obtenidos y el análisis de pigmentos confirmó la acumulación de delphinidina en 16 de los 19 transformantes analizados (Tabla 3). El contenido de delphinidina fue de un 100% como máximo (promedio: 87%) pero la cantidad máxima de pigmento fue muy baja a 0,035 mg por gramo de pétalos y el color de la flor se alteró únicamente del color 158d de la tabla de colores de la RHS (grupo amarillo-blanco) al color 56a (grupo rojo) o 65b (grupo rojo-púrpura), y tampoco se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC ni se pudo obtener la rosa azul diana.

TABLA 3

No. de Planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	87	0,002	0,00 0	0,000	0,058	0,354
2	100	0,004	0,000	0,338	0,059	1,921
3	82	0,002	0,001	0,203	0,039	1,382
4	100	0,003	0, 000	0,245	0,050	1,840
5	76	0,005	0,001	0,000	0,280	3,288
6	0	0,000	0,000	0,000	0,098	0,409
7	0	0,000	0,001	0,000	0,101	0,358
8	0	0,000	0,001	0,000	0,030	2,277
9	83	0,013	0,003	0,000	0,117	0,841

No. de Planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
10	85	0,011	0,002	0,000	0,104	3,300
11	84	0,020	0,004	0,000	0,168	3,137
12	91	0,025	0,002	0,294	0,119	1,252
13	90	0,028	0,003	0,000	0,075	1,912
14	91	0,014	0,001	0,000	0,152	2,667
15	90	0,035	0,004	0,000	0,086	1,616
16	83	0,023	0,005	0,000	0,117	2,267
17	91	0,014	0,001	0,000	0,113	0,825
18	76	0,003	0,001	0,000	0,085	2,351
19	82	0,005	0,001	0,000	0,054	1,616

Del: Delfinidina, M: Miricetina

Ejemplo 9. Transferencia del gen F3'5'H (#40) del pensamiento y el gen DFR de la petunia a Tineke

El plásmido pE2113 (Mitsuhara et al., Plant Cell Physiol. 37, 45-59, 1996) se digirió con HindIII y XbaI para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 800 bp, que se ligó con pBin19 (Bevan M., Binary Agrobacterium Vector for plant transformation. Nucl. Acid Res. 12. 8711-21, 1984) digerido anteriormente con HindIII y XbaI. El plásmido obtenido se denominó pCGP1391. Otro plásmido, el pCGP669 (WO94/21840), contiene el promotor del gen chalcona sintasa-A (CHS-A) de la petunia. Este plásmido se digirió con EcoRI, se cortó y luego digirió con HindIII.

El fragmento de ADN de aproximadamente 700 bp se ligó con pCGP1391 que había sido digerido previamente con HindIII y SnaBI y el plásmido obtenido se denominó pCGP1707. Asimismo, se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kb obtenido mediante digestión completa del plásmido pCGP1961 que contenía ADNc F3'5'H #40 del pensamiento con BamHI y a digestión parcial con XhoI. El plásmido obtenido mediante ligazón de este pUE5H digerido con BamHI y XhoI se denominó pUEBP40. El plásmido pUEBP40 se digirió con EcoRV y XbaI y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 5,5 kb.

Este fragmento se ligó con un fragmento de aproximadamente 700 bp obtenido mediante la digestión del plásmido pCGP1707 con HindIII, el corte de los extremos y la digestión adicional con XbaI para obtener el plásmido pUFBP40. A continuación, el pUFBP40 se digirió parcialmente con HindIII y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 3,4 kb que contenía el potenciador del promotor 35S de la coliflor, el promotor CHS-A, el ADNc F3'5'H #40 del pensamiento y el terminador nos. Este fragmento se ligó con un fragmento de ADN obtenido mediante digestión parcial del pBEPD2 con HindIII para obtener un plásmido de vector binario pBPDBP8 (FIG. 4). El plásmido se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* Ag10.

El plásmido pBPDBP8 (FIG. 4) se transfirió al cultivar de rosa blanca "Tineke" y se obtuvieron 53 transformantes. El color de la flor se alteró en 17 de los transformantes obtenidos y el análisis de pigmentos confirmó la acumulación de delfinidina en 8 de los 9 transformantes analizados (Tabla 4). El contenido de delfinidina fue de un 93% como máximo (promedio: 79%) pero la cantidad máxima de pigmento fue muy baja a 0,014 mg por gramo de pétalos y el color de la flor se alteró únicamente del color 158d de la tabla de colores de la RHS (grupo amarillo-blanco) al color 56a (grupo rojo) o 65b (grupo rojo-púrpura), y tampoco se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC ni se pudo obtener la rosa azul diana. Esto sugirió que la variedad Tineke no es una variedad que carece únicamente del gen DFR.

TABLA 4

No. de planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	0	0,000	0,001	0,000	0,018	2,023
2	9	0,001	0,006	na	na	na
3	93	0,011	0,001	0,000	0,036	2,724
4	86	0,007	0,001	0,000	0,076	2,957
5	71	0,013	0,006	0,000	0,073	2,503
6	87	0,014	0,002	0,000	0,058	3,390
7	78	0,005	0,002	0,000	0,049	1,241

No. de planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
8	47	0,004	0,004	0,000	0,070	1,800
9	78	0,004	0,001	0,000	0,029	2,326

na: no hubo análisis/medición

Ejemplo 10. Transferencia del gen F3'5'H (#18) del pensamiento y el gen DFR de la petunia a WKS36

5 El plásmido pBPDBP2 (FIG. 3) se transfirió al cultivar de rosa blanca "WKS36" y se obtuvieron 138 transformantes. El color de la flor se alteró en 10 de los transformantes obtenidos y se confirmó la acumulación de delfinidina en todas las plantas (Tabla 5). El contenido de delfinidina fue de un 91% como máximo (promedio: 60%) pero la cantidad máxima de pigmento fue muy baja a 0,033 mg por gramo de pétalos y el color de la flor se alteró únicamente a un color rosado muy claro, y tampoco se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC ni se pudo obtener la rosa azul diana. Esto sugirió que la variedad WKS36 no es una variedad que carece únicamente del gen DFR.

5 TABLA 5

No. de planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	60	0,008	0,005	0,381	0,169	2,291
2	40	0,006	0,009	0,633	0,486	2,911
3	54	0,005	0,005	0,654	0,336	3,460
4	43	0,016	0,021	0,000	0,656	2,469
5	53	0,009	0,008	0,404	0,325	2,397
6	53	0,004	0,003	0,498	0,251	2,768
7	45	0,013	0,016	0,000	0,381	1,537
8	83	0,004	0,001	0,000	0,156	1,632
9	80	0,033	0,008	0,000	0,557	3,766
10	91	0,013	0,000	0,000	0,184	2,610

10 **Ejemplo 11. Transferencia del gen F3'5'H (#18) del pensamiento y el gen DFR de la petunia a WKS36**

El plásmido obtenido mediante el reemplazo del sitio Ascl del plásmido pUCAP (van Engelen et al., Transgenic Research 4, 288-290, 1995) con el ligador PacI se denominó pUCPP. Por otra parte, se obtuvo un cassette de expresión preparado ligando el promotor de chalcona sintasa de la rosa, el ADN5'F3#18 del pensamiento y el terminador nos de la siguiente forma.

15 Se extrajo el ADN cromosómico de hojas jóvenes del cultivar de rosa Kardinal (Tanaka et al., Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031, 1995). Una porción de aproximadamente 100 de ADN se digirió parcialmente con Sau3AI y se recuperaron fragmentos de ADN de aproximadamente 20-kb mediante el gradiente de densidad de sacarosa.

20 Estos se ligaron con fago lambda EMBL3 (por ejemplo, Stratagene) que había sido digerido con BamHI y se preparó una biblioteca de ADN cromosómico mediante el protocolo recomendado por el fabricante. La biblioteca se analizó con un procedimiento conocido públicamente (Tanaka et al., Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031, 1995) mediante el uso del ADNc de la chalcona sintasa de la rosa (DNA database: GenBank Accession No. AB038246) como sonda. Entre los clones de cromosomas de chalcona sintasa obtenidos, se encontró el lambda CHS20 que incluyó una secuencia de ADN de aproximadamente 6,4 kb secuencia arriba desde el codón de inicio de la chalcona sintasa. El fragmento de ADN de aproximadamente 2,9 kb obtenido mediante la digestión de lambda CHS20 con HindIII y EcoRV incluye la región promotora de chalcona sintasa.

25 Este fragmento se ligó con un fragmento obtenido mediante la digestión del pUC19 (Yanisch-Perron C et al., Gene 33:103-119, 1985) con HindIII y SmaI. Este se denominó pCGP1116. La secuencia de la región promotora de chalcona sintasa incluida en este se enumera como la SEQ ID NO: 21. Se ligó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,9 kb obtenido mediante la digestión del pCGP1116 con HindIII y KpnI, con un fragmento de ADN obtenido mediante la digestión del pJB1 (Bodeau, Molecular and genetic regulation of Bronze-2 and other maize anthocyanin genes. Dissertation, Stanford University, USA, 1994) con HindIII y KpnI para obtener el pCGP197.

30 Por otra parte, un fragmento de ADN de aproximadamente 300 bp que contenía el terminador de la nopalina sintasa, obtenido mediante la digestión del pUE5 con SacI y KpnI, se cortó y se ligó con el pBluescriptSK que había sido digerido con EcoRV y BamHI y cortado. Un plásmido entre los obtenidos en los que el extremo del terminador se encontraba

cerca del sitio Sall del pBluescriptSK se denominó pCGP1986. Un fragmento de ADN obtenido mediante la digestión del pCGP1986 con XhoI, el corte de los extremos y la digestión adicional con Sall se ligó con un fragmento de ADN obtenido mediante la digestión del pCGP197 con HindIII, el corte de los extremos y la digestión adicional con Sall, para obtener el pCGP2201.

5 A continuación, el fragmento de ADN obtenido mediante la digestión del pCGP2201 con Sall y el corte de los extremos se ligó con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb (que contenía el gen flavo-5-
 10 hidroxilasa del pensamiento) obtenido mediante la digestión del pCGP1959 con BamHI y KpnI y el corte de los extremos. El plásmido de aquellos obtenidos en los cuales el promotor de chalcona sintasa de la rosa había sido insertado en una dirección que permitía la transcripción del gen flavonoide 3'
 15 pCGP2203. El plásmido pCGP2203 se recuperó mediante la digestión con HindIII y SacI. El fragmento de ADN se clonó en los sitios HindIII y Sad del pUCPP y el plásmido resultante se denominó pSPB459. A continuación, el plásmido pE2113 se digirió con SnaBI y se insertó un ligador de BamHI (Takara) para obtener un plásmido denominado pUE6.

El fragmento de ADN de aproximadamente 700 bp obtenido mediante la digestión del pUE6 con HindIII y BamHI se ligó con un fragmento de ADN de aproximadamente 2,2 kb obtenido mediante la digestión del pCGP1405 (WO96/36716) con BamHI y BglII y con el vector binario pBinplus (van Engelen et al., Transgenic Research 4, 288-290, 1995) digerido con HindIII y BamHI, para obtener el pSPB460. Un fragmento de ADN de aproximadamente 5 kb obtenido mediante la digestión del pSPB459 con PacI se introdujo en el sitio PacI del pSPB460 para obtener el pSPB461 (FIG. 5), que tiene los genes DFR de la petunia y F3'5'H #18 del pensamiento unidos en la dirección hacia delante en el vector binario. Este plásmido se modifica para la expresión constitutiva del gen DFR de la petunia en plantas y la transcripción específica del gen F3'5'H #18 del pensamiento en los pétalos de las flores. El plásmido se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* Ag10.

El plásmido pSPB461 (FIG. 5) se transfirió a la rosa blanca "WKS36" y se obtuvieron 229 transformantes. El color de la flor se alteró en 16 de los transformantes obtenidos y se confirmó la acumulación de delphinidina en 12 de las plantas a las cuales se le analizó el pigmento (Tabla 6). El contenido de delphinidina fue de un 79% como máximo (promedio: 58%) pero la cantidad máxima de pigmento fue muy baja a 0,031 mg por gramo de pétalos y el color de la flor se alteró únicamente a un color rosa muy claro, y tampoco se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC y no se pudo obtener la rosa azul diana. Esto sugirió que la variedad WKS36 no es una variedad que carece únicamente del gen DFR.

TABLA 6

No. de planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	39	0,002	0,004	0,000	0,414	3,744
2	52	0,006	0,005	0,000	0,465	3,363
3	27	0,002	0,005	0,000	0,342	3,703
4	58	0,014	0,010	0,000	0,430	2,780
5	62	0,008	0,005	0,498	0,281	2,189
6	72	0,002	0,001	0,000	0,193	2,391
7	71	0,010	0,004	0,000	0,152	4,021
8	79	0,031	0,008	0,403	0,215	2,660
9	26	0,004	0,011	0,000	0,249	2,331
10	54	0,007	0,006	0,000	0,299	2,085
11	74	0,017	0,006	0,145	0,248	3,505
12	74	0,013	0,005	0,000	0,229	2,005

30 **Ejemplo 12. Transferencia del gen F3'5'H (#18) de pensamiento, el gen DFR de petunia y el gen antocianina β-glucosida aciltransferasa de perilla a WKS36**

El gen que comprende el codón de inicio agregado al gen hidroxicinamoil CoA: antocianiβa -glucosida aciltransferasa (3AT) de perilla se denominó pSAT208F (Yonekura-Sakakibara et al., Plant Cell Physiol. 41, 495-502, 2000). Un fragmento de ADN de aproximadamente 3,9 kb obtenido mediante la digestión del pSPB580 (PCT/AU03/00079) con BamHI y XhoI se ligó con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kb obtenido mediante la digestión del pSAT208F con BamHI y XhoI.

El plásmido obtenido se digirió con AscI y se recuperó un fragmento de ADN que contenía el promotor E1235S, el gen 3AT de perilla y el terminador de proteínas de transferencia de fosfolípidos de la petunia. El fragmento de ADN se insertó

5 en el sitio Ascl del pSPB461 para obtener el plásmido pSPB472 (FIG. 6) donde las direcciones de transcripción de los genes 3AT de perilla, el DFR de petunia y el F³H #18 del pensamiento se encontraba n en dirección 3. Este plásmido se modifica para la expresión constitutiva del gen 3AT de la perilla y el gen DFR de la petunia en plantas y la transcripción específica del gen F³H #18 del pensamiento en los pétalos de las flores. El plásmido se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* Ag10.

10 El plásmido pSPB472 (FIG. 6) se transfirió a la rosa blanca "WKS36" y se obtuvieron 75 transformantes. El color de la flor se alteró en cuatro de los transformantes obtenidos y se confirmó la acumulación de delphinidina en las tres plantas a las cuales se le analizó el pigmento (Tabla 7). El contenido de delphinidina fue de un 67% como máximo (promedio: 49%) pero la cantidad máxima de pigmento fue muy baja a 0,011 mg por gramo de pétalos y el color de la flor se alteró únicamente a un color rosa muy claro y tampoco se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC ni se pudo obtener la rosa azul diana. Esto sugirió que la variedad WKS36 no es una variedad que carece únicamente del gen DFR.

TABLA 7

No. de planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	32	0,003	0,006	0,219	0,236	1,972
2	67	0,011	0,005	0,520	0,329	3,234
3	46	0,006	0,007	0,000	0,579	3,874

15 Por tanto, a pesar del análisis de varias rosas blancas, no fue posible obtener un cultivar que careciera únicamente del gen DFR. En otras palabras, no fue posible obtener la rosa azul mediante el procedimiento para la creación del clavel azul (WO94/28140).

Ejemplo 13. Inhibición del gen DFR de la rosa mediante cosupresión

20 El plásmido pBERD1 se transfirió a la rosa violeta claro "Lavande" y se obtuvieron 26 transformantes. No obstante, ninguna de las plantas presentó alteración del color, lo que sugirió que es difícil inhibir el gen DFR endógeno de la rosa mediante cosupresión.

Ejemplo 14. Detección de rosas de colores

25 Los cultivares para la creación de rosas azules luego se seleccionaron entre las rosas de colores. Después de seleccionar visualmente 136 líneas de los cultivares de rosas de colores con tonos relativamente azules, 89 de las líneas se sometieron al análisis de pigmento. Los valores obtenidos para las rosas de colores examinadas se muestran en las tablas 8 a 10.

TABLA 8

Nombre	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
Lavande	0,078	0,000	0,000	0,451	0,078
Madam Violet	0,055	0,000	0,000	1,780	0,189
Vol de Nuit	0,317	0,003	0,000	2,661	0,316
Blue Moon	0,049	0,000	0,000	1,341	0,119
Seiryu	0,015	0,000	0,000	3,030	1,300
WKS077	1,875	0,008	0,000	1,430	0,247
WKS078	0,211	0,000	0,000	1,286	0,133
WKS079	2,864	0,003	0,000	1,030	0,106
WKS080	0,040	0,000	0,000	0,362	0,047
WKS081	0,032	0,000	0,000	4,480	1,563
WKS082	0,074	0,000	0,000	2,400	0,196
WKS083	0,018	0,405	0,000	0,146	0,962
WKS084	0,055	0,000	0,000	1,269	0,159
WKS087	0,032	0,000	0,000	0,797	0,134

ES 2 370 175 T3

Nombre	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
WKS089	0,030	0,000	0,000	1,484	0,317
WKS090	1,571	0,007	0,000	1,346	0,339
WKS091	0,045	0,169	0,000	0,186	0,899
WKS092	0,038	0,002	0,000	1,358	0,135
WKS095	0,015	0,000	0,000	2,945	0,255
WKS096	0,024	0,000	0,000	2,032	0,349
WKS097	0,991	0,002	0,000	1,659	0,185
WKS100	0,051	0,000	0,000	1,410	0,615
WKS101	0,424	0,000	0,000	2,194	0,482
WKS104	0,066	0,000	0,000	2,347	0,424
WKS107	1,202	0,004	0,000	3,134	0,460
WKS114	0,429	0,000	0,000	3,509	0,541
WKS116	0,026	0,000	0,000	3,440	0,868
WKS117	0,027	0,000	0,000	0,227	0,149
WKS121	0,669	0,006	0,000	1,336	0,453
WKS123	0,487	0,003	0,000	3,663	0,826
Peo: Peonidina					

TABLA 9

Nombre	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
WKS124	0,022	0,045	0,000	0,192	2,012
WKS125	0,187	0,002	0,000	0,349	0,089
WKS126	0,544	0,002	0,000	2,226	0,895
WKS127	1,609	0,008	0,006	2,278	0,528
WKS128	1,844	0,003	0,007	2,576	0,409
WKS129	1,645	0,002	0,006	0,450	0,160
WKS130	1,332	0,008	0,005	1,599	0,525
WKS131	0,582	0,002	0,001	2,460	0,567
WKS132	1,101	0,006	0,000	0,298	0,208
WKS133	2,773	0,003	0,000	1,263	0,230
WKS133	3,487	0,011	0,023	0,414	0,108
WKS134	1,084	0,001	0,002	2,777	0,413
WKS135	0,241	0,007	0,001	0,803	0,113
WKS136	0,637	0,000	0,003	1,451	0,062
WKS137	1,208	0,014	0,002	1,034	1,027
WKS138	1,955	0,006	0,000	3,857	0,855
WKS139	0,285	0,003	0,000	1,363	0,538
WKS140	0,075	0,000	0,000	0,291	0,097
WKS141	0,197	0,000	0,000	0,358	0,045
WKS142	1,906	0,029	0,106	1,890	1,860

ES 2 370 175 T3

Nombre	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
WKS143	1,125	0,027	0,020	1,596	1,129
WKS144	2,685	0,484	0,000	0,160	0,184
WKS145	0,948	0,006	0,000	3,086	1,222
WKS146	3,108	0,047	0,000	0,228	0,398
WKS 147	0,593	0,003	0,004	3,619	0,924
WKS148	0,059	0,000	0,000	3,113	0,466
WKS149	1,101	0,013	0,000	1,481	1,866
WKS150	0,498	0,562	0,000	0,061	0,156
WKS151	0,947	1,073	0,00 0	0,038	0,227
WKS152	0,303	1,599	0,000	0,015	0,464
Peo: Peonidina					

TABLA 10

Nombre	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
WKS153	1,178	0,796	0,000	0,020	0,179
WKS154	0,219	0,659	0,000	0,007	0,265
WKS155	0,547	0,006	0,000	1,274	0,073
WKS156	0,851	0,005	0,000	1,139	0,238
WKS157	0,955	0,555	0,000	0,133	1,315
WKS158	0,634	0,005	0,000	0,526	0,219
WKS159	0,106	0,320	0,000	0,034	0,959
WKS160	0,750	0,005	0,000	2,283	0,768
WKS161	0,262	0,419	0,000	0,197	1,115
WKS162	0,039	0,564	0,000	0,041	0,447
WKS163	0,184	0,002	0,000	0,756	0,105
WKS164	0,918	0,012	0,000	1,954	2,832
WKS165	0,097	0,604	0,000	0,026	0,197
WKS166	0,116	0,015	0,000	0,488	0,566
WKS167	0,647	0,002	0,000	2,507	0,499
WKS168	1,109	0,029	0,000	1,797	2,328
WKS169	0,070	0,003	0,000	0,208	1,369
Baby Faurax	2,247	0,022	0,058	4,518	0,580
Indigo	0,891	0,006	0,000	5,781	3,820
Intermezzo	0,040	0,000	0,000	1,075	0,443
James Veitch	1,281	0,004	0,002	2,087	0,923
Lagoon	0,053	0,000	0,000	2,887	0,315
Magenta	0,126	0,000	0,000	1,062	0,191
MRS COLVILLE	1,666	0,012	0,000	3,500	2,940
Mme. Isaac Pereire	0,629	0,003	0,000	1,021	0,105

Nombre	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
Mme. de La Roche-Lambert	0,869	0,005	0,000	4,994	2,794
Roseraie de L'hay	0,364	0,005	1,256	0,156	0,077
Rose de Rescht	1,348	0,004	0,000	4,0 27	0,842
Rose du Roi a Fleurs Pourpres	2,556	0,017	0,000	0,968	0,411
Peo: Peonidina					

Ejemplo 15. Transferencia del gen 'FBI' (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5 -aciltransferasa de *Torenia* a Lavande

La modificación de las antocianinas con grupos acilo aromáticos puede estabilizar las antocianinas y producir un color más azul (por ejemplo, WO96/25500). El siguiente experimento fue realizado con el objetivo de producir antocianinas de tipo delfinidina acilada.

Se obtuvo el ARN de los pétalos de la flor de verano *Torenia* y se preparó el poliA⁺ARN a partir de estos. Se preparó una biblioteca de ADNc a partir del poliA⁺ARN con λ ZAPII (Stratagene) como vector, mediante el uso de un kit de preparación de biblioteca de ADNc direccional (Stratagene) de conformidad con el protocolo recomendado del fabricante. La antocianina principal de *Torenia* se modifica con un grupo acilo aromático en la posición 5 de la glucosa (Suzuki et al., Molecular Breeding 2000 6, 239-246) y por tanto la antocianina aciltransferasa se expresa en los pétalos de *Torenia*.

La antocianina aciltransferasa incluye la secuencia de aminoácidos conservada Asp-Fe-Gli-Trp-Gli-Lis y el ADN sintético correspondiente puede utilizarse como cebador para obtener el gen antocianina aciltransferasa (WO96/25500). Específicamente, se utilizaron 10 ng de ADNc de hebra simple para la construcción de la biblioteca de ADNc de *Torenia* como plantilla y se utilizaron 100 ng de cebador ATC (5-GA(TC)TT(TC)GGITGGGGIAA-3', I: inosina) (SEQ ID NO: 17) y 100 ng de cebador oligo dT (5-TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCGAG-3') (SEQ ID NO: 18) como cebadores para la PCR con Taq polimerasa (Takara, Japan) en las condiciones recomendadas por el fabricante.

La PCR se llevó a cabo en 25 ciclos de reacción con un ciclo que consistió en 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C. El fragmento de ADN de aproximadamente 400 bp que fue obtenido se recuperó con el gen Clean II (BIO, 101. Inc.) de conformidad con el protocolo recomendado por el fabricante y se subclonó en el pCR-TOPO. La determinación de la secuencia de nucleótidos reveló una secuencia homóloga al gen aciltransferasa de genciana (Fujiwara et al., 1998, Plant J. 16 421-431). La secuencia de nucleótidos se determinó mediante el procedimiento de imprimación de colorante (Applied Biosystems), mediante el uso del secuenciador 310 o 377 (ambos de Applied Biosystems).

El fragmento de ADN se marcó con DIG mediante el uso de un kit de detección marcador DIG (Japan Roche) y se utilizó para el análisis de una biblioteca de ADNc de *Torenia* mediante la hibridación de placas de conformidad con el protocolo recomendado por el fabricante. Doce de los clones de señal positiva obtenidos se seleccionaron de forma aleatoria, los plásmidos se recuperaron y se determinaron sus secuencias de nucleótidos. Estos mostraron una alta homología con la antocianina aciltransferasa. Se determinó la secuencia de nucleótidos total del ADNc en el clon denominado pTAT7. La secuencia de nucleótidos se enumera como la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se enumera como la SEQ ID NO: 8.

Después de digerir el pBE2113-GUS (Mitsuhara et al., Plant Cell Physiol. 37, 45-59, 1996) con SacI, se cortaron los extremos y se insertó un ligador XhoI de 8 bp (Takara). Se insertó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb obtenido mediante la digestión del pTAT7 con BamHI y XhoI en los sitios BamHI y XhoI de este plásmido para obtener el pSPB120. Después de digerir el pSPB120 con SnaBI y BamHI, se cortaron los extremos y se realizó el enlace para obtener el pSPB120'. Por otra parte, el plásmido pCGP1961 que contiene el ADNc F3'5'H #18 del pensamiento se digirió completamente con BamHI y después se digirió parcialmente con XhoI para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kb que se recuperó y se ligó con pUE5H digerido anteriormente con BamHI and XhoI, para obtener el plásmido que se denominó pUEBP40.

Después de digerir el pUEBP40 con SnaBI y BamHI, se cortaron los extremos y se realizó una ligazón para obtener el pUEBP40'. Este plásmido pUEBP40' se digirió parcialmente con HindIII para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 2,7 kb que se recuperó y se unió con un fragmento de ADN obtenido mediante digestión parcial del pSPB120' con HindIII. De los plásmidos obtenidos, el vector binario que tiene el gen neomicina fosfotransferasa, el gen F3'5'H #40 del pensamiento y el gen 5AT de *Torenia* ligados en ese orden en la misma dirección de la secuencia del borde derecho del vector binario, se denominó pSPB130 (FIG. 7). Este plásmido se modifica para la expresión constitutiva del gen F3'5'H #40 del pensamiento y el gen 5AT de *Torenia* en plantas y la transcripción específica de genes en los pétalos de la flor. El plásmido se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* Ag10.

5 El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color violeta claro "Lavande" y se obtuvieron 41 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en 20 de las 32 plantas cuyo pigmento se analizó (tablas 11 y 12). El contenido de delphinidina fue de un 71% como máximo (promedio: 36%). El color de la flor se alteró del 186c de la tabla de colores de la RHS (grupo púrpura grisáceo) al 79d (grupo púrpura). La proporción de antocianinas aciladas fue tan solo de aproximadamente un 30% del total de antocianinas. Tras la medición espectral de las antocianinas aciladas, el alcance máximo de longitud de onda de absorción se había movido hacia la longitud de onda más larga en 4nm de la delphinidina 3,5-diglucosida, pero debido a la baja proporción entre el total de antocianinas, no se logró ningún efecto claro en el color de la flor.

TABLA 11

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	0	9	0,005	0,050	na	na	na
2	0	11	0,009	0,069	na	na	na
3	0	10	0,010	0,087	na	na	na
4	0	22	0,028	0,102	na	na	na
5	5	51	0,073	0,069	na	na	na
6	4	57	0,093	0,069	na	na	na
7	5	48	0,039	0,042	na	na	na
8	13	0	0,000	0,065	na	na	na
9	17	9	0,006	0,062	na	na	na
10	26	0	0,000	0,104	na	na	na
11	17	67	0,074	0,036	na	na	na
12	0	0	0,000	0,131	na	na	na
13	0	0	0,000	0,083	na	na	na
14	6	48	0,084	0,092	na	na	na
15	0	20	0,020	0,081	na	na	na
16	42	13	0,020	0,131	0,000	0,637	0,020
17	32	36	0,032	0,058	na	na	na
18	7	0	0,000	0,146	na	na	na
19	0	0	0,000	0,069	na	na	na
20	0	0	0,000	0,142	na	na	na
21	0	0	0,000	0,080	na	na	na

na: no hubo análisis/medición

TABLA 12

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
22	0	0	0,000	0,069	na	na	na
23	0	0	0,000	0,057	na	na	na
24	18	4	0,006	0,149	na	na	na
25	17	4	0,008	0,208	na	na	na
26	0	0	0,000	0,188	na	na	na
27	0	0	0,000	0,078	na	na	na
28	17	67	0,090	0,044	na	na	na

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
29	17	71	0,057	0,024	na	na	na
30	16	40	0,040	0,059	na	na	na
31	21	70	0,082	0,036	0,305	0,062	0,008
32	18	62	0,066	0,040	na	na	na
na: no hubo análisis/medición							

Ejemplo 16. Transferencia del gen 'FBI' (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5 -aciltransferasa de *Torenia* a WKS100

5 El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color violeta claro "WKS100" y se obtuvieron 146 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en 56 de las 63 plantas cuyo pigmento se analizó (tablas 13 - 15). El contenido de delphinidina fue de un 95% como máximo (promedio: 44%). El color de la flor se alteró del 56d de la tabla de colores de la RHS (grupo rojo) al 186d (grupo púrpura grisáceo). No obstante, no se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC y no se pudo obtener la rosa azul diana.

TABLA 13

No. de planta	Acilación (%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	20	75	0,036	0,012	0,000	2,944	0,974	0,322
2	16	51	0,027	0,027	0,000	1,685	1,734	0,512
3	13	50	0,024	0,024	0,000	0,000	1,382	1,912
4	23	50	0,037	0,037	0,000	na	na	na
5	9	25	0,013	0,033	0,005	na	na	na
6	10	26	0,034	0,097	0,000	na	na	na
7	13	65	0,053	0,028	0,000	1,936	1,184	0,760
8	13	65	0,044	0,024	0,000	1,622	1,065	0,562
9	14	62	0,033	0,021	0,000	2,096	1,444	0,710
10	14	95	0,137	0,008	0,000	0,000	0,156	1,097
11	10	62	0,036	0,022	0,000	2,025	1,194	0,799
12	5	59	0,054	0,038	0,000	2,194	1,289	0,783
13	9	43	0,033	0,044	0,000	2,542	1,803	0,734
14	9	50	0,030	0,031	0,000	0,020	1,971	0,741
15	1	70	0,066	0,028	0,000	1,652	1,659	0,867
16	0	20	0,008	0,023	0,008	0,308	2,632	1,463
17	1	63	0,068	0,040	0,000	2,037	2,128	1,554
18	21	51	0,037	0,035	0,000	2,659	1,936	1,002
19	0	0	0,000	0,095	0,000	na	na	na
20	0	0	0,000	0,037	0,000	na	na	na
21	0	23	0,026	0,086	0,003	0,182	4,554	3,083
22	4	71	0,110	0,044	0,000	3,265	1,643	1,341
23	12	65	0,051	0,025	0,002	1,356	0,888	0,387
24	6	58	0,038	0,027	0,000	2,374	2,016	0,809
25	5	52	0,044	0,040	0,000	2,651	2,546	1,108
na: no hubo análisis/medición								

ES 2 370 175 T3

TABLA 14

No. de planta	Acilación(%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
26	6	64	0,033	0,019	0,000	2,707	1,546	0,605
27	16	0	0,000	0,041	0,000	na	na	na
28	16	13	0,007	0,050	0,000	0,249	3,359	1,459
29	12	7	0,007	0,095	0,000	na	na	na
30	15	9	0,007	0,069	0,000	na	na	na
31	15	8	0,007	0,081	0,000	na	na	na
32	7	7	0,007	0,094	0,000	na	na	na
33	13	10	0,006	0,055	0,000	na	na	na
34	14	46	0,078	0,090	0,002	na	na	na
35	7	8	0,007	0,078	0,000	na	na	na
36	3	48	0,045	0,039	0,010	3,050	2,304	1,326
37	2	39	0,029	0,046	0,000	na	na	na
38	1	55	0,073	0,059	0,000	1,608	2,138	1,015
39	1	33	0,030	0,063	0,000	na	na	na
40	2	59	0,050	0,035	3,651	2,727	1,076	2
41	17	15	0,011	0,061	0,000	na	na	na
42	0	0	0,000	0,048	0,002	na	na	na
43	3	17	0,009	0,046	0,000	na	na	na
44	40	32	0,027	0,058	0,000	na	na	na
45	2	0	0,000	0,031	0,000	na	na	na
46	2	0	0,000	0,038	0,000	na	na	na
47	1	8	0,004	0,048	0,000	na	na	na
48	19	57	0,046	0,034	0,000	2,626	2,165	0,900
49	10	59	0,047	0,032	0,000	1,737	1,901	1,054
50	2	70	0,057	0,024	0,000	1,545	0,880	0,694

na: no hubo análisis/medición

TABLA 15

No. de planta	Acilación (%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
51	4	10	0,006	0,056	0,000	na	na	na
52	16	12	0,006	0,039	0,002	na	na	na
53	34	84	0,156	0,030	0,000	5,100	1,056	0,511
54	32	89	0,131	0,017	0,000	3,907	0,803	0,431
55	29	89	0,098	0,013	0,000	3,687	0,453	0,226
56	21	83	0,083	0,017	0,000	2,679	0,817	0,431
57	14	8	0,007	0,082	0,000	na	na	na
58	9	44	0,034	0,041	0,002	2,258	2,054	0,672
59	7	51	0,040	0,038	0,000	2,246	2,151	0,765
60	0	7	0,008	0,111	0,000	na	na	na

No. de planta	Acilación (%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
61	1	48	0,069	0,073	0,000	1,558	1,730	0,565
62	13	0	0,000	0,036	0,000	na	na	na
63	16	14	0,005	0,029	0,000	na	na	na

na: no hubo análisis/medición

Ejemplo 17. Transferencia del gen F3'5'H (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5-aciltransferasa de *Torenia* a WKS116

5 El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color violeta claro "WKS116" y se obtuvieron 282 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en 33 de las 36 plantas cuyo pigmento se analizó (tablas 16 y 17). El contenido de delphinidina fue de un 80% como máximo (promedio: 73%). El color de la flor se alteró del 196d de la tabla de colores de la RHS (grupo verde grisáceo) al 186d (grupo púrpura grisáceo). No obstante, no se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC y no se pudo obtener la rosa azul diana.

TABLA 16

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	1,8	78	0,015	0,004	0,746	0,753	0,507
2	12,7	78	0,097	0,028	1,826	2,352	1,572
3	5,9	78	0,030	0,009	1,000	1,452	0,934
4	0,0	76	0,030	0,010	0,813	0,990	0,480
5	2,6	72	0,038	0,015	1,279	1,835	0,832
6	0,0	72	0,019	0,007	0,839	0,983	0,642
7	3,1	75	0,033	0,011	1,131	1,476	0,877
8	1,9	75	0,028	0,009	0,761	0,977	0,466
9	2,6	76	0,034	0,011	na	na	na
10	2,7	73	0,031	0,011	na	na	na
11	4,4	77	0,033	0,010	1,001	1,003	0,618
12	7,0	74	0,035	0,012	0,849	0,945	0,577
13	9,3	74	0,025	0,009	na	na	na
14	3,2	80	0,044	0,011	1,045	0,959	0,545
15	4,5	75	0,031	0,010	1,115	1,256	0,729
16	10,5	71	0,028	0,012	1,055	1,155	0,670
17	1,7	51	0,016	0,016	0,330	1,537	1,052
18	10,5	77	0,112	0,033	2,008	2,976	2,216
19	0,0	0	0,000	0,010	na	na	na
20	0,0	30	0,007	0,015	na	na	na
21	na	56	0,013	0,010	0,197	1,960	1,463
22	4,4	47	0,006	0,007	na	na	na
23	3,6	77	0,026	0,008	na	na	na

na: no hubo análisis/medición

TABLA 17

No. de Planta	Acilación(%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
24	7,2	82	0,028	0,006	1,295	1,272	0,805
25	3,5	83	0,035	0,007	na	na	na
26	17,4	26	0,009	0,025	na	na	na
27	39,3	91	0,101	0,010	3,499	0,563	0,178
28	28,2	85	0,047	0,005	na	na	na
29	0,0	0	0,000	0,025	na	na	na
30	10,4	89	0,092	0,012	na	na	na
31	1,9	0	0,000	0,036	na	na	na
32	5,8	76	0,027	0,009	na	na	na
33	16,8	88	0,066	0,009	na	na	na
34	10,5	87	0,103	0,015	na	na	na
35	13,7	38	0,021	0,034	na	na	na
36	18,3	95	0,051	0,003	na	na	na

na: no hubo análisis/medición

Ejemplo 18. Transferencia del gen F35'H (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5-aciltransferasa de *Torenia* a WKS124

5

El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color anaranjado claro "WKS124" y se obtuvieron 0,50 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en 13 de las 15 plantas cuyo pigmento se analizó (tablas 18). El contenido de delphinidina fue de un 95% como máximo (promedio: 82%). El color de la flor se alteró del 52d de la tabla de colores de la RHS (grupo rojo) al 71c (grupo púrpura grisáceo). No obstante, no se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC y no se pudo obtener la rosa azul diana.

TABLA 18

No. de Planta	Acilación(%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	0,6	0	0,000	0,013	0,069	na	na	na
2	35,5	75	0,256	0,051	0,034	0,066	0,093	1,190
3	43,0	78	0,385	0,068	0,041	0,039	0,046	1,197
4	44,2	85	0,811	0,120	0,028	0,106	0,094	1,021
5	na	86	0,907	0,123	0,024	0,219	0,066	0,852
6	4,6	0	0,000	0,023	0,075	na	na	na
7	7,9	90	1,498	0,169	0,008	0,905	0,143	0,679
8	8,4	90	1,403	0,146	0,008	0,971	0,145	0,827
9	26,7	88	0,521	0,066	0,003	0,623	0,108	0,853
10	21,9	89	0,504	0,058	0,003	0,636	0,098	0,727
11	26,0	85	0,928	0,145	0,019	0,424	0,152	0,455
12	3,8	95	1,017	0,058	0,000	1,161	0,140	0,262
13	11,6	84	0,939	0,156	0,025	0,748	0,128	0,262
14	38,5	69	0,166	0,071	0,007	0,000	0,059	0,776
15	27,1	55	0,137	0,040	0,074	0,000	0,021	2,330

na: no hubo análisis/medición

10

Ejemplo 19. Transferencia del gen F3'5'H (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5-aciltransferasa de *Torenia* a WKS132

5 El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color rojo fuerte "WKS132" y se obtuvieron 24 transformantes. La acumulación de delfinidina se confirmó en 6 de las 7 plantas cuyo pigmento se analizó (tablas 19). El contenido de delfinidina fue de un 43% como máximo (promedio: 12%). El color de la flor se alteró del 57a de la tabla de colores de la RHS (grupo rojo-púrpura) al 66a (grupo rojo-púrpura). No obstante, no se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC y no se pudo obtener la rosa azul diana.

TABLA 19

No. de Planta	Acilación(%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)
1	1,8	0,4	0,008	1,872	0,009
2	1,0	0,0	0,000	1,409	0,010
3	21,3	11,4	0,237	1,841	0,007
4	6,8	42,5	0,461	0,619	0,006
5	7,6	9,5	0,204	1,936	0,011
6	na	0,016	1,3	1,227	0,007
7	23,7	5,4	0,081	1,407	0,005

Ejemplo 20. Transferencia del gen F3'5'H (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5-aciltransferasa de *Torenia* a WKS133

10

El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color rojo-violeta oscuro "WKS133" y se obtuvieron 16 transformantes. La acumulación de delfinidina se confirmó en las ocho plantas cuyo pigmento se analizó (tabla 20). El contenido de delfinidina fue de un 34% como máximo (promedio: 11%). El color de la flor se alteró del 53a de la tabla de colores de la RHS (grupo rojo) al 61a (grupo rojo-púrpura). No obstante, no se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC y no se pudo obtener la rosa azul diana.

15

TABLA 20

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	10,3	23,7	1,322	4,253	0,009	0,004	0,691	0,792	0,133
2	11,8	33,8	1,192	2,324	0,005	0,003	0,621	0,422	0,093
3	6,1	12,9	0,009	0,060	0,000	0,000	0,102	0,500	0,048
4	3,8	9,1	0,363	3,627	0,005	0,008	na	na	na
5	15,8	2,0	0,078	3,774	0,009	0,000	0,045	0,939	0,472
6	11,5	2,7	0,135	4,771	0,011	0,005	0,046	0,576	0,034
7	13,3	3,0	0,180	5,800	0,009	0,009	0,100	0,937	0,179
8	12,2	3,5	0,161	4,470	0,009	0,009	0,068	0,738	0,148

na: no hubo análisis/medición

Ejemplo 21. Transferencia del gen F3'5'H (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5-aciltransferasa de *Torenia* a WKS137

20

El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color rojo-violeta oscuro "WKS137" y se obtuvieron 20 transformantes. La acumulación de delfinidina se confirmó en las 17 plantas cuyo pigmento se analizó (tabla 21). El contenido de delfinidina fue de un 1,3% como máximo (promedio: 0,4%). No se observó ninguna alteración en el color de la flor con respecto al color 61b de la tabla de colores (grupo rojo-púrpura).

TABLA 21

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	0,5	0,3	0,008	2,821	0,037	0,000	na	na	na
2	0,8	0,3	0,010	3,384	0,051	0,000	na	na	na
3	0,4	0,3	0,005	1,982	0,014	0,000	na	na	na
4	0,6	0,2	0,008	3,344	0,057	0,000	na	na	na
5	0,7	0,4	0,011	3,145	0,035	0,000	na	na	na
6	0,7	1,3	0,025	2,919	0,040	0,003	na	na	na
7	0,4	0,3	0,008	2,820	0,045	0,000	na	na	na
8	0,5	0,4	0,010	2,467	0,042	0,000	na	na	na
9	0,7	0,2	0,010	3,836	0,024	0,000	na	na	na
10	0,1	0,5	0,008	1,743	0,016	0,000	na	na	na
11	0,7	0,4	0,011	2,593	0,027	0,003	na	na	na
12	0,6	0,3	0,007	2,393	0,022	0,000	0,048	3,026	2,812
13	1,4	0,2	0,009	3,756	0,065	0,000	na	na	na
14	0,7	0,4	0,008	2,149	0,024	0,001	na	na	na
15	0,8	0,5	0,007	2,281	0,041	0,000	na	na	na
16	0,5	0,5	0,007	1,314	0,014	0,000	na	na	na
17	1,0	0,2	0,007	2,892	0,051	0,000	na	na	na

na: no hubo análisis/medición

Ejemplo 22. Transferencia del gen F3'5'H (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5-aciltransferasa de *Torenia* a WKS140

5 El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color violeta claro "WKS140" y se obtuvieron 197 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en 37 de las 45 plantas cuyo pigmento se analizó (tablas 22 y 23). El contenido de delphinidina fue de un 94% como máximo (promedio: 47%). El color de la flor se alteró del 186d de la tabla de colores de la RHS (grupo púrpura grisáceo) al 79d (grupo púrpura). No obstante, no se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC y no se pudo obtener la rosa azul diana.

TABLA 22

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido de Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	3,5	0,0	0,000	0,090	na	na	na
2	2,5	0,0	0,000	0,093	0,096	2,429	0,246
3	5,5	63,5	0,061	0,035	0,688	1,090	0,106
4	13,2	17,7	0,013	0,059	na	na	na
5	5,4	11,6	0,017	0,129	na	na	na
6	3,6	12,3	0,011	0,078	na	na	na
7	13,6	11,7	0,009	0,069	na	na	na
8	4,1	22,3	0,012	0,041	0,057	1,950	0,492
9	3,3	0,0	0,000	0,071	na	na	na
10	2,6	18,6	0,017	0,076	na	na	na
11	4,2	18,6	0,012	0,052	0,130	3,101	1,172

ES 2 370 175 T3

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido de Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
12	6,5	25,0	0,026	0,079	0,251	2,300	0,592
13	1,3	0,0	0,000	0,0 62	0,000	2,200	0,552
14	22,7	85,4	0,261	0,045	1,649	0,943	0,126
15	20,9	57,4	0,093	0,069	0,481	1,418	0,182
16	16,4	39,9	0,052	0,078	na	na	na
17	15,2	50,8	0,074	0,072	na	na	na
18	6,1	22,6	0,036	0,111	0,148	2,152	0,279
19	2,7	0,0	0, 000	0,033	na	na	na
20	9,1	52,6	0,041	0, 037	na	na	na
21	4,4	46,2	0,075	0,087	na	na	na
22	8,5	34,7	0,040	0,075	0,195	1, 847	0,394
23	11,0	3 0,9	0,018	0,040	0,155	1,106	0,142
24	13,4	46,8	0,056	0,063	na	na	na
25	2,8	5,1	0,006	0,107	na	na	na
na: no hubo análisis/medición							

TABLA 23

No. de Planta	Acilación(%)	Contenido de Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
26	4,1	6,8	0,00 7	0,098	na	na	na
27	31,4	93,4	0,252	0,0 18	1,434	0,361	0,052
28	13,4	86,7	0,101	0,016	1,237	1,740	0,499
29	32,3	94,2	0,200	0,012	0,862	0,131	0,029
30	13,0	89,7	0,176	0,020	0 ,553	0,289	0,026
31	12,3	87,1	0,150	0,022	1,007	0,674	0,135
32	6,7	9,9	0,009	0,086	na	na	na
33	11,5	67,4	0,108	0,052	na	na	na
34	5,0	11,2	0,014	0,110	0,074	2,588	0,659
35	12,5	79,7	0,088	0,022	1,192	1,185	0,574
36	15,0	83,4	0,065	0,013	1,478	1,147	0,570
37	1,8	0,0	0,000	0,068	na	na	na
38	1,3	44,3	0,105	0,132	0,582	3,259	1,232
39	2,5	73,6	0,114	0,041	na	na	na
40	14,0	85,3	0,165	0,028	1,881	1,035	0,180
41	0,5	4,3	0,006	0,144	na	na	na
42	9,9	53,3	0,040	0,035	0,373	1,038	0,164
43	33,5	87,4	0,275	0, 040	1,851	0,701	0,148
44	1,3	0,0	0,000	0,073	na	na	na
45	1 ,5	0,0	0,000	0,062	na	na	na
na: no hubo análisis/medición							

Ejemplo 23. Transferencia del gen F3'5'H (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5-aciltransferasa de *Torenia* a WKS77

El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color rojo-púrpura oscuro "WKS77" y se obtuvieron 35 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en las 17 plantas cuyo pigmento se analizó (tabla 24). El contenido de delphinidina fue de un 57% como máximo (promedio: 33%). El color de la flor se alteró del 57a de la tabla de colores de la RHS (grupo rojo-púrpura) al 71a (grupo rojo-púrpura). No obstante, no se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC y no se pudo obtener la rosa azul diana.

TABLA 24

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido de Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	6,2	42,5	1,15 3	1,552	0,008	0,484	0,679	0,196
2	7,6	38,6	0,618	0,979	0,005	0,267	0,465	0,094
3	3,9	4 0,4	0,706	1,030	0,011	1,266	1,768	0,722
4	2,0	46,9	0,372	0,417	0,004	0,363	0,608	0,276
5	5,4	40,6	0,540	0,784	0,00 5	1,077	1,809	0,645
6	2,0	44,7	1,078	1,325	0,009	0,516	1,034	0,382
7	2,1	46,5	0,398	0, 453	0,005	0,353	0,792	0,569
8	5,8	39,7	0,647	0,980	0,005	0,425	0,706	0,183
9	4,7	40,0	0,844	1,268	0,000	0,310	0,76 4	0,199
10	7,6	39,7	1,345	2,033	0,009	0,350	0,635	0,119
11	14,1	2,9	0,068	2,274	0,013	na	na	na
12	12,8	6,9	0,126	1,688	0,009	na	na	na
13	12,7	4,2	0,109	2,468	0,012	0,060	1,541	0,366
14	20,9	13,0	0,704	2,669	0,00 0	0,407	2,502	0,694
15	19,3	43,5	1,011	1,308	0,007	0,357	0,843	0,276
16	19,6	6,1	0,092	1,414	0,010	0,120	1,740	0,4 77
17	22,8	56,6	1,0 68	0,814	0,004	0,604	0,503	0,126
na: no hubo análisis/medición								

Ejemplo 24. Transferencia del gen F3'5'H (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5-aciltransferasa de *Torenia* a WKS82

El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color violeta claro "WKS82" y se obtuvieron 89 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en las 44 plantas cuyo pigmento se analizó (tablas 25 y 26). El contenido de delphinidina fue de un 91% como máximo (promedio: 49%). El color de la flor se alteró del 186d de la tabla de colores de la RHS (grupo púrpura grisáceo) al 80c (grupo púrpura-violeta). No obstante, no se logró ningún color del grupo violeta, grupo violeta-azul o grupo azul de conformidad con la RHSCC y no se pudo obtener la rosa azul diana.

TABLA 25

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido de Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	10,5	52,3	0,0 55	0,050	0,000	0,430	0,883	0,083
2	15,9	62,5	0,091	0,054	0,000	0,570	0,549	0,030
3	15,9	36,6	0,044	0,076	0,000	0,6 22	2,221	0,102
4	6, 8	40,0	0,023	0,034	0,000	0,247	0,986	0,172
5	15,0	82,9	0,087	0,018	0,000	5,451	0,403	0,042
6	na	89,7	0,072	0,008	0,000	0,853	0,163	0,062

ES 2 370 175 T3

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido de Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
7	9,5	89,5	0,101	0,012	0,000	0,719	0,144	0,0 19
8	14,7	11,4	0,01 2	0,090	0,000	na	na	na
9	11,6	29,3	0,02 4	0,059	0,000	na	na	na
10	8,7	15,2	0,01 0	0,053	0,000	na	na	na
11	7,9	59,0	0,04 6	0,032	0,000	0,580	0,619	0,022
12	8,5	55,6	0,060	0,048	0,000	1,318	1,615	0,165
13	13,9	42,3	0,026	0,035	0,000	0,6 03	1,094	0,052
14	1 0,1	10,3	0,008	0,073	0,000	na	na	na
15	10,6	18,8	0,018	0,079	0,000	na	na	na
16	9,3	11,7	0,009	0,066	0,000	na	na	na
17	14,3	76,2	0,112	0,035	0,000	3,741	1,587	0,377
18	12,7	76,7	0,101	0,031	0,000	1,608	0,656	0,075
19	9,8	71,7	0,057	0,022	0,000	1,403	0,455	0,04 1
20	5,3	14,1	0,011	0,068	0,000	0,132	2,999	0,720
21	3,5	18,5	0,008	0,035	0,000	na	na	na
22	7,7	23,1	0,017	0,055	0,000	0,141	0,929	0,034
23	5,4	19,0	0,015	0,065	0,000	0,297	4,128	1,350

na: no hubo análisis/medición

TABLA 26

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido de Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
24	1,1	42,1	0,0 36	0,050	0,000	0,609	2,929	0,679
25	22,7	91,0	0,079	0,008	0,000	0,964	0,218	0,018
26	6,1	61,3	0,048	0,030	0,000	0, 490	0,468	0,029
27	8,7	91,3	0,097	0,009	0,000	2,053	0,339	0,123
28	9,4	59,9	0,060	0,040	0,000	1,537	1,631	0,422
29	5,5	51,2	0,040	0,0 38	0,000	0,688	0,723	0,038
30	5,1	61,4	0,056	0,032	0,003	0,637	0,537	0,087
31	7,0	53,3	0,037	0,032	0,000	0,706	1,0 32	0,051
32	5,7	58, 1	0,071	0,051	0,000	1,592	1,478	0,220
33	4,3	64,6	0,092	0,050	0,000	0,849	0,753	0,035
34	6,4	61,7	0,042	0,026	0,00 0	0,477	0,468	0,023
35	8,9	58,8	0,048	0,034	0,000	0,646	0,928	0,063
36	6,2	11,6	0,007	0,057	0,000	0,094	1,132	0,06 6
37	7,1	51,2	0,038	0,036	0,000	0,911	1,135	0,079
38	5,8	50,8	0,029	0,028	0,000	0,868	1,105	0,096
39	5,5	47,0	0,027	0,023	0,007	1,366	1,632	0,105
40	4,9	67,0	0,044	0,022	0,000	0,795	0,586	0,051
41	na	61,1	0,053	0,033	0, 000	1,310	1,466	0,259

No. de Planta	Acilación (%)	Contenido de Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
42	9,6	71,0	0,074	0,030	0,000	0,460	0,337	0,023
43	1,2	27,6	0,009	0,024	0,000	na	na	na
44	5,2	13,8	0,013	0,078	0,000	na	na	na

na: no hubo análisis/medición

Ejemplo 25. Transferencia del gen F3'5'H (#40) del pensamiento y el gen antocianina 5-aciltransferasa de *Torenia* a WKS91

5 El plásmido pSPB130 (FIG. 7) se transfirió a la variedad de rosa de color anaranjado claro "WKS91" y se obtuvieron 10 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en solamente una de las dos plantas cuyo pigmento se analizó (tabla 27). El contenido de delphinidina fue de un 2% como máximo. No se observó ninguna alteración en el color de la flor con respecto al color 43c (grupo rojo) de la tabla de colores de la RHS.

TABLA 27

No. de Planta	Acilación(%)	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)
1	0,7	0,0	0,000	0,090	0,307
2	0,0	1,8	0,006	0,040	0,295

Ejemplo 26. Expresión del gen F3'5'H (#40) del pensamiento y el gen DFR del lirio y supresión del gen DFR endógeno de la rosa en Lavande

10 Se obtuvo el ARN de los pétalos de las flores cortadas del lirio azul y se preparó el poliA⁺ARN a partir de estos. Se preparó una biblioteca de ADNc a partir del poliA⁺ARN con λZAPII (Stratagene) como vector, mediante el uso de un kit de preparación de biblioteca de ADNc (Stratagene) de conformidad con el protocolo recomendado del fabricante. El fragmento de gen DFR del lirio se preparó mediante el mismo procedimiento que se utilizó para obtener el fragmento de gen DFR de la genciana (Tanaka et al, Plant Cell Physiol, 37, 711-716 1996).

15 El fragmento de ADN obtenido de aproximadamente 400 bp se recuperó con el gen Clean de conformidad con el protocolo recomendado del fabricante y se subclonó en el pCR-TOPO. La determinación de la secuencia de nucleótidos reveló una secuencia homóloga al gen DFR de la rosa. El fragmento de ADN se utilizó para el análisis de la biblioteca de ADNc del lirio y se obtuvo el ADNc del DFR del lirio que incluye la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Se determinó la secuencia total de nucleótidos del ADNc en el clon denominado pSPB906. La secuencia de nucleótidos se enumera como la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se enumera como la SEQ ID NO: 10.

A continuación, se ligó un fragmento de ADN de aproximadamente 3,9 kb obtenido mediante la digestión del pSPB580 con BamHI y XhoI, con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kb obtenido mediante la digestión del pSPB906 con BamHI y XhoI y el plásmido obtenido se denominó pSPB909.

25 Se preparó un vector para la transcripción del ARN bicatenario para el ADNc del DFR de la rosa en plantas de la siguiente forma. Un fragmento de ADN de aproximadamente 3,5 kb (que incluye el promotor Mac1, el ADNc del DFR de la rosa y el terminador mas) obtenido mediante la digestión parcial del pCGP1364 (Tanaka et al., Plant Cell Physiol, (1995) 36, 1023-1031) con PstI se insertó en el sitio PstI del pUC19 (Yanisch-Perron C et al., Gene 33:103-119, 1985) para obtener los plásmidos, entre los cuales un plásmido con el sitio HindIII del pUC19 cerca del promotor MacI se denominó pCGP1394.

30 A continuación, se ligó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,4 kb obtenido mediante la digestión del pCGP1394 con HindIII y SacII, con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,9 kb obtenido mediante la digestión del pCGP1394 con PstI, el corte de los extremos y la digestión adicional con SacII y con un fragmento de vector binario obtenido mediante la digestión del pBinPLUS con SacI, el corte de los extremos y la digestión adicional con HindIII, para obtener pSPB185. El plásmido pSPB185 se digirió con XbaI, se cortó y se ligó con un ligador Sall para obtener el pSPB521. Un fragmento de ADN de aproximadamente 700 bp obtenido mediante la digestión del pUE6 con HindIII y BamHI se ligó con un fragmento de ADN de vector binario obtenido mediante la digestión del pSPB521 con HindIII y SacI y con un fragmento del gen GUS obtenido mediante la digestión del pE2113 con BamHI y SacI, para obtener pSPB528.

40 El plásmido pSPB528 es un vector binario que tiene un gen estructural insertado entre el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor que contiene potenciador y el terminador de manopina sintasa, que se expresa en plantas. Asimismo, para acortar la secuencia no traducida del extremo 5' del ADNc del DFR de la rosa en pCGP645, el plásmido pCGP645 se digirió con SmaI y PvuII, se cortó y se volvió a ligar para obtener el pCGP645s.

La secuencia del extremo 5' del ADNc del DFR de la rosa se obtuvo mediante amplificación por PCR con el uso del pCGP645s como plantilla y un cebador inverso y el cebador sintético RDF310 (5'-CCCTCGAGCCCTTGATGGCCTCGTGC-3') (SEQ ID NO: 19) como cebadores y se clonó en el pCRTPOPO. Se determinó la secuencia de nucleótidos del ADN y se confirmó la ausencia de errores mediante PCR. Este plásmido se denominó pSPB569. Asimismo, la secuencia del extremo 5del ADNc del DFR de la rosa con una longitud diferente se obtuvo por amplificación mediante el uso del pCGP645s como plantilla y un cebador inverso y el cebador sintético RDF830 (5'-GGGTCGACGCGGCCCTCTGCTTTCGG-3') (SEQ ID NO: 20) como cebadores y se clonó en el pCRTPOPO. Se determinó la secuencia de nucleótidos del ADN y se confirmó la ausencia de errores mediante PCR.

Este plásmido se denominó pSPB570. Se ligó un fragmento de ADN del vector binario obtenido mediante la digestión del pSPB528 con BamHI y SacI y un fragmento de ADN de aproximadamente 0,3 kb obtenido mediante la digestión del pSPB569 con SacI y XhoI, con un fragmento de ADN obtenido mediante la digestión del pSPB570 con BamHI y Sall, para obtener el pSPB572. Este vector se diseñó para la transcripción del ARN bicatenario para el ADNc del DFR de la rosa en plantas.

El plásmido pUE6 se digirió con SacI y se cortó y el ligador Sall se insertó para obtener el pUE8. Se introdujo un fragmento de ADN obtenido mediante la digestión del pUE8 con HindIII y EcoRI en los sitios HindIII y EcoRI del pBinPLUS para obtener el plásmido pSPB189. Se ligó un fragmento de ADN de aproximadamente 3,7 kb obtenido mediante la digestión del pSPB189 con BamHI y Sall, con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kb obtenido mediante la digestión completa del pCGP1961 con BamHI seguida por la digestión parcial con XhoI, para obtener el plásmido pSPB567. Después de la digestión del Pacl y el tratamiento de desfosforilación del pSPB572, se ligó con un fragmento de ADN de aproximadamente 2,8 kb obtenido mediante la digestión del pSPB567 con Pacl y se seleccionó un plásmido con transcripción del gen nptII y el gen F3'5'H #40 del pensamiento en la misma dirección y se denominó pSPB905.

Después de la digestión del Ascl y el tratamiento de desfosforilación del pSPB905, se ligó con un fragmento de ADN de aproximadamente 2,5 kb obtenido mediante la digestión del pSPB909 con Ascl y se seleccionó un plásmido con transcripción del gen DFR del lirio en la misma dirección en la que se obtuvo el gen nptII y se denominó pSPB919 (FIG. 8). Se espera que este plásmido permita la transcripción del gen DFR del lirio y el gen F3'5'H #40 del pensamiento en la rosa, al tiempo que suprima la expresión del gen DFR de la rosa debido a la transcripción del ARN bicatenario. El plásmido se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* Ag10.

El plásmido pSPB919 (FIG. 8) se transfirió a la variedad de rosa de color violeta claro "Lavande" y se obtuvieron 87 transformantes. La acumulación de delfinidina se confirmó en 31 de las 38 plantas cuyo pigmento se analizó (tablas 28 y 29). El contenido de delfinidina fue de un 100% como máximo (promedio: 76%). El color de la flor se alteró del 186c de la tabla de colores de la RHS (grupo púrpura grisáceo) al 85a,b (grupo violeta).

Se extrajo el ARN de los pétalos de la rosa de la misma forma que se explicó anteriormente y después de separar el ARN mediante la electroforesis en gel de azarosa, se transfirió al Hybond N (Amersham) (por ejemplo, Tanaka et al., 1995). El ARNm se detectó mediante el uso de un kit DIG Northern Starter (Roche) con el protocolo recomendado del fabricante. El ARNm del DFR de la rosa se detectó mediante el uso del pCGP645 (Tanaka et al., Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031, 1995) como plantilla y un cebador T7 de transcripción como sonda.

La detección del ARNm del pensamiento #40 se logró mediante el uso del pCGP1961 como plantilla y un cebador T7 de transcripción como sonda. La detección del ARNm del DFR del lirio se logró mediante el uso del pSPB906 como plantilla y un cebador T7 de transcripción como sonda. Se detectaron los genes F3'5'H #40 del pensamiento y DFR del lirio en las rosas con alteración de color. Por otra parte, el ARNm del DFR de la rosa se redujo de forma significativa en comparación con el huésped y se detectó una banda en la posición de bajo peso molecular, lo que indicó la descomposición del ARNm del DFR de la rosa.

TABLA 28

No. de Planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	0,0	0,000	0,1 05	0,036	0,856	0,038
2	0,0	0,000	0,125	na	na	na
3	0,0	0,00 0	0,091	0,023	0,851	0,101
4	0,0	0,000	0,116	0,000	1,336	0,087
5	0,0	0,000	0,048	na	na	na
6	88,5	0,086	0,011	1,626	1,187	0,411
7	90,8	0,089	0,009	0,797	1,548	0,087
8	84,0	0,046	0,009	0,163	0,6 99	0,016

ES 2 370 175 T3

No. de Planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
9	87,8	0,0 62	0,009	0,193	0,760	0,022
10	89,3	0,072	0,009	0,210	0,575	0,033
11	91,5	0,049	0,005	0,398	0,805	0,050
12	91,5	0,032	0,003	0,100	0,811	0,014
13	85,7	0,040	0,007	0,092	0,497	0,012
14	64,9	0,040	0,021	0,263	0,327	0,015
15	88,3	0,041	0,005	na	na	na
16	66,4	0,011	0,006	0,036	1,221	0,030
17	79,7	0,008	0,002	0,030	0,765	0,009
18	100,0	0,010	0,000	0,048	1, 343	0,067
19	95,9	0 ,040	0,002	0,159	0,136	0,004
20	65,4	0,016	0,00 8	0,090	1,244	0,048
21	18,8	0,011	0,049	0,048	0,855	0,020
22	0,0	0,000	0,110	0,000	1,274	0,079
23	0,0	0,000	0,140	0,000	1,952	0,200
na: no hubo análisis/medición						

TABLA 29

No. de Planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
24	41,4	0,102	0 ,144	0,265	0,417	0,015
25	34,3	0,042	0,081	0,16 7	0,429	0,024
26	34 ,6	0,023	0,043	na	na	na
27	41,4	0,082	0 ,116	0,232	0,385	0,019
28	37,7	0,046	0,076	0,25 4	0,429	0,018
29	36 ,1	0,032	0,057	0,151	0,235	0,042
30	97,2	0,052< /td>	0,002	0,208	0,088	0,004
31	93,0	0,038	0,003	0,347	0,137	0,007
32	98,2	0,101	0,002	0,339	0,258	0,029
33	91,3	0,039	0,004	na	na	na
34	91,9	0,041	0,004	0,332	0,120	0,007
35	96,8	0,052	0,002	na	n a	na
36	96,7	0,084< /td>	0,003	0,342	0,168	0,010
37	88,0	0,014	0,002	0,076	1,000	0,029
38	84,5	0,016	0,003	0,074	1,121	0,025
na: no hubo análisis/medición						

Ejemplo 27. Expresión del gen F3'S'H (#40) del pensamiento y el gen DFR de *Nierembergia* y supresión del gen DFR endógeno de la rosa en Lavande

5 El ARN se obtuvo a partir de los pétalos del cultivar *Nierembergia hybrida*, Fairy Bell Patio Light Blue (Suntory Flowers Co., Ltd.) y el poliA⁺ARN se preparó a partir de estos. Se preparó una biblioteca de ADNc a partir del poliA⁺ARN con λZAPII (Stratagene) como vector, mediante el uso de un ~~kit~~ ^{kit} de biblioteca de ADNc (Stratagene) de conformidad con el protocolo recomendado del fabricante. La biblioteca de ADNc se analizó mediante el uso del ADNc de DFR de la petunia marcado con DIG (del pCGP1405).

10 Las condiciones de análisis fueron de conformidad con el procedimiento de hibridación de placas mediante el uso de un sistema de marcado con DIG, de conformidad con el protocolo recomendado del fabricante. No obstante, la concentración de formaldehído fue de un 30% para la prehibridación y las soluciones amortiguadoras de hibridación y la hibridación se llevó a cabo durante la noche a 37°C. La membrana se lavó a 55°C, en 5×SSC que contenía SDS al 1%. Los plásmidos se recuperaron de 20 placas entre las numerosas señales positivas y se determinaron sus secuencias de nucleótidos mediante el uso de un cebador inverso (Takara). Estos mostraron una alta homología con los genes DFR de otras plantas incluida la petunia. Se determinó la secuencia total de nucleótidos del ADNc en el clon denominado pSPB709. La secuencia de nucleótidos se enumera como la SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se enumera como la SEQ ID NO: 12.

20 Un fragmento de ADN de aproximadamente 3,9 kb obtenido mediante la digestión del pSPB580 con BamHI y XhoI se ligó con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kb obtenido mediante la digestión del pSPB709 con BamHI y XhoI para obtener el plásmido pSPB910. Después de la digestión del Ascl y el tratamiento de desfosforilación del pSPB910, se ligó con un fragmento de ADN de aproximadamente 2,5 kb obtenido mediante la digestión del pSPB910 con Ascl y se obtuvo un plásmido con transcripción del gen DFR de *Nierembergia* en la misma dirección en la que se obtuvo el gen nptII que se denominó pSPB920 (FIG. 9). Se espera que este plásmido permita la transcripción del gen DFR de *Nierembergia* y el gen F3'S'H #40 del pensamiento en la rosa, al tiempo que suprima la expresión del gen DFR de la rosa debido a la transcripción del ARN bicatenario. El plásmido se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* Ag10.

25 El plásmido pSPB920 (FIG. 9) se transfirió a la variedad de rosa de color violeta claro "Lavande" y se obtuvieron 56 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en 23 de las 24 plantas cuyo pigmento se analizó (tablas 30). El contenido de delphinidina fue de un 100% como máximo (promedio: 43%). El color de la flor se alteró del 186c de la tabla de colores de la RHS (grupo púrpura grisáceo) al 85b (grupo violeta).

TABLA 30

No. de Planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	69,5	0,025	0,002	0,081	2,265	0,066
2	85,4	0,024	0,004	0,114	1,355	0,032
3	71,8	0,006	0,002	0,043	0,781	0,027
4	100,0	0,012	0,000	0,414	0,283	0,030
5	88,2	0,015	0,002	0,506	0,126	0,030
6	100,0	0,013	0,000	0,430	0,123	0,008
7	33,3	0,019	0,038	na	na	na
8	37,3	0,012	0,020	na	na	na
9	48,2	0,012	0,013	na	na	na
10	18,9	0,011	0,049	0,053	1,023	0,022
11	39,7	0,037	0,056	0,120	1,157	0,035
12	9,4	0,010	0,095	na	na	na
13	11,0	0,008	0,062	na	na	na
14	24,4	0,017	0,054	0,128	1,852	0,181
15	12,4	0,015	0,102	na	na	na
16	89,7	0,089	0,010	0,530	1,424	0,165
17	15,4	0,006	0,035	na	na	na
18	22,3	0,006	0,019	0,018	1,286	0,038

ES 2 370 175 T3

No. de Planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
19	10,4	0,007	0,058	0,03 9	1,673	0,045
20	28 ,3	0,006	0,015	0,028	0,932	0,025
21	35,2	0,015	0,028	0,105	0,743	0,028
22	16,0	0,010	0,052	na	na	na
23	0, 0	0,000	0,018	0,013	1,764	0,027
24	13,7	0,007	0,042	0,033	1,469	0,041
na: no hubo análisis/medición						

Ejemplo 28. Herencia de rasgos en la progenie

El cruzamiento se llevó a cabo mediante el uso de un transformante (LA/919-2-13) obtenido mediante la transferencia del pSPB919 (FIG. 8) a la variedad de rosa de color violeta claro "Lavande" como progenitor de polen y la WKS77 o WKS133 no recombinante como progenitora madre (Suzuki, S., "Bara, Hanazufu", Shogakkann, p, 256-260, 1990). El fruto se recolectó en el 100º día después de la polinización. La producción de semillas se logró en primer lugar mediante el pelado del fruto, la reducción del aquenio, el pelado del aquenio y después la extracción de la célula germinativa y su colocación en un papel de filtro humedecido en un plato. Para la producción de semillas se utilizó agua esterilizada que contenía 1 ml/l PPM™ (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology, Inc.) y 50 mg/l kanamicina y las plántulas se cultivaron mediante el enmacetamiento únicamente de las plantas con brotes.

10 La acumulación de delfinidina se confirmó en las 40 progenies transformantes cuyo pigmento se analizó (tablas 31 y 32). El contenido de delfinidina fue de un 99% como máximo (promedio: 46%).

TABLA 31

No. de Planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)
1	89,8	0,494	0,056	0,000	0,000
2	96,1	3,900	0,153	0,005	0,000
3	55,9	0,836	0,660	0,000	0,000
4	24,6	0,041	0,127	0,00 0	0,000
5	23,5	1,108	3,605	0,009	0,002
6	25,9	0,191	0,545	0,003	0,000
7	0,5	0,013	2,552	0,012	0,002
8	75,8	0,283	0,090	0,000	0,000
9	9 5,9	1,420	0,061	0,000	0,000
10	30,8	0,862	1,841	0,007	0,105
11	13,3	0,068	0,441	0,004	0,000
12	23,9	0,529	1,667	0,023	0,000
13	43,7	0,280	0,362	0,00 0	0,000
14	19,3	0,035	0,145	0,000	0,000
15	0,6	0,008	1,418	0,021	0,000
16	20,8	0,048	0,183	0,000	0,000
17	92,5	2,257	0,1 77	0,007	0,000
18	66,4	2,496	1,247	0,015	0 ,000
19	42,4	0,369	0,497	0,004	0,000
20	75,6	0,597	0,183	0,010	0,000
21	19,6	0 ,271	1,103	0,008	0,000
22	71,0	0,107	0,044	0,000	0,000
23	0,6	0,006	0,850	0,004	0,000

TABLA 32

No. de Planta	Contenido Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)
24	16,7	0,053	0,263	0,000	0,000
25	71,8	0,211	0,083	0,000	0,000
26	18,6	0,177	0,769	0,003	0,000
27	1,3	0,009	0,652	0,004	0,000
28	59,7	0,183	0,124	0,000	0,000
29	39,6	0,124	0,187	0,003	0,000
30	21,4	0,187	0,684	0,003	0,000
31	0,6	0,005	0,763	0,004	0,000
32	38,8	0,226	0,353	0,003	0,000
33	50,5	0,154	0,151	0,000	0,000
34	28,0	0,267	0,682	0,003	0,000
35	83,9	0,204	0,039	0,000	0,000
36	64,9	0,380	0,205	0,000	0,000
37	78,8	0,239	0,064	0,000	0,000
38	97,4	0,614	0,016	0,000	0,000
39	98,7	0,805	0,011	0,000	0,000
40	54,9	0,083	0,068	0,000	0,000

Ejemplo 29. Expresión del gen F5'H (#40) del pensamiento y el gen DFR del lirio y supresión del gen DFR endógeno de la rosa en WKS140

5 El plásmido pSPB919 se transfirió a la variedad de rosa de color violeta claro "WKS140" y se obtuvieron 89 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en 74 de las 79 plantas cuyo pigmento se analizó. El contenido de delphinidina fue de un 100% como máximo (promedio: 68%). El color de la flor se alteró del 186d de la tabla de colores de la RHS (grupo púrpura grisáceo) fundamentalmente al 84c (grupo violeta).

TABLA 33

No. de Planta	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)
1	0,0%	0,0000	0,0423	0,0000
2	89,9%	0,0242	0,0027	na
3	90,0%	0,0245	0,0027	na
4	88,6%	0,0093	0,0012	na
5	43,5%	0,0042	0,0054	na
6	91,2%	0,0118	0,0011	na
7	81,2%	0,0027	0,0006	na
8	81,0%	0,0173	0,0041	na
9	73,9%	0,0733	0,0259	na
10	62,9%	0,0321	0,0190	na
11	91,9%	0,0962	0,0084	na
12	99,1%	0,1606	0,0015	na
13	94,7%	0,0588	0,0033	na
14	100,0%	0,0839	0,0000	na

No. de Planta	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)
15	0,0 %	0,0000	0,0005	na
16	98,4%	0,0296	0,0005	na
17	80,4%	0,1748	0,045 1	na
18	94,6%	0,019 0	0,0000	na
19	0,0%	0,0000	0,0714	na
2 0	34,3%	0,0099	0,0191	na
21	30,9%	0,0126	0,0282	na
22	65,6%	0,0294	0,0154	na
23	24,1%	0,0205	0,0646	na

na: no hubo análisis/medición

Ejemplo 30. Expresión del gen F5'H (#40) del pensamiento y el gen DFR del lirio y supresión del gen DFR endógeno de la rosa en WKS77

5 El plásmido pSPB919 se transfirió a la variedad de rosa de color rojo-púrpura oscuro "WKS77" y se obtuvieron 50 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en 21 de las 23 plantas cuyo pigmento se analizó. El contenido de delphinidina fue de un 81% como máximo (promedio: 19%). El color de la flor se alteró del 57a de la tabla de colores de la RHS (grupo rojo-púrpura) al 77b (grupo púrpura).

TABLA 34

No. de Planta	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)
1	26,0%	1,2028	3,4033	0,0117
2	41,5%	0,6473	0,9093	0,0048
3	80,8%	0,2210	0,0526	na
4	68,0%	0,1865	0,0878	na
5	68,5%	0,2090	0,0951	0,0010
6	1,5%	0,0119	0,7731	0,0051
7	1,5%	0,0114	0,7304	0,0041
8	0,2%	0,0069	2,926 6	0,0063
9	0,2%	0,0 017	1,0791	0,0062
10	0,0%	0,0000	0,5013	0,0043
11	0,1%	0,0028	2,3418	0,0110
12	0,4%	0,0091	2,4603	0,0126
13	0,2%	0,0040	1,7766	0,0096
14	0,3%	0,0026	0,9046	0,0 052
15	0,0%	0,0000	1,6063	0,0100
16	22,2%	0,3279	1,1392	0,0049
17	24,0%	0,2638	0,8288	0,0052
18	1,4%	0,0240	1,67 77	0,0118
19	1,1%	0 ,0186	1,6352	0,0101
20	26,7%	0,2645	0,7230	0,0037
21	22,7%	0,2200	0,7460	0,0046
22	40,1%	0,89 29	1,3374	0,0071
na: no hubo análisis/medición				

Ejemplo 31. Expresión del gen F35'H (#40) del pensamiento y el gen DFR de *Nierembergia* y supresión del gen DFR endógeno de la rosa en WKS77

5 El plásmido pSPB920 se transfirió a la variedad de rosa de color rojo-púrpura oscuro "WKS77" y se obtuvieron 30 transformantes. La acumulación de delfinidina se confirmó en 26 de las 27 plantas cuyo pigmento se analizó. El contenido de delfinidina fue de un 98% como máximo (promedio: 60%). El color de la flor se alteró del 57a de la tabla de colores de la RHS (grupo rojo-púrpura) al 77b (grupo púrpura).

TABLA 35

No. de Planta	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)
1	93,9%	0,1679	0,0110	0,0000
2	97,6%	0,2311	0,0058	na
3	96,3%	0,1684	0,0065	na
4	97,1%	0,1012	0,0017	na
5	9,6%	0,0946	0,7810	0,1104
6	21,9%	0,1462	0,5166	0,0034
7	12,7%	0,1097	0,7495	0,0049
8	97,9%	0,1942	0,0042	na
9	98,1%	0,1228	0,0024	na
10	3,2%	0,0360	1,0689	0,0035
11	3,1%	0,0267	0,9587	0,0032
12	4,8%	0,1138	2,2 562	0,0049
13	6,2%	0,1066	1,5999	0,0080
14	96,5%	0,3541	0,0132	na
15	2,1%	0,0173	0,7852	0,0068
16	94,7%	0,2898	0,0160	0,0000
17	96, 7%	0,0819	0,0020	0,0000
18	95,8%	0,6969	0,0309	na
19	96,4%	0,4868	0,0181	na
20	64,3%	0,3092	0,1724	na
21	26,9%	0,2740	0,7431	0,0025
22	19,9%	0,3760	1,5028	0,0071
23	88,2%	0,0316	0,0042	na
24	94,2%	0,0259	0,0016	na
25	90,4%	0,0481	0,0051	na
na: no hubo análisis/medición				

Ejemplo 32. Expresión del gen F35'H (#40) del pensamiento y el gen DFR de la petunia y supresión del gen DFR endógeno de la rosa en WKS77

10 El plásmido pSPB921 se transfirió a la variedad de rosa de color rojo-púrpura oscuro "WKS77" y se obtuvieron 15 transformantes. La acumulación de delfinidina se confirmó en 12 de las 13 plantas cuyo pigmento se analizó. El contenido de delfinidina fue de un 98% como máximo (promedio: 60%). El color de la flor se alteró del 57a de la tabla de colores de la RHS (grupo rojo-púrpura) al 72b (grupo rojo-púrpura).

TABLA 36

No. de Planta	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)
1	90,0%	0,0549	0,0061	na
2	38,4%	0,3397	0,5402	0,0041
3	56,9%	0,7834	0,5824	0,0099
4	58,5%	0,0196	0,0139	na
5	90,3%	0,1336	0,0144	na
6	90,9%	0,1251	0,0126	na
7	86,7%	0,1771	0,0274	na
8	91,6%	0,0113	0,0010	na
9	97,5%	0,0864	0,0022	na
10	9,5%	0,2687	2,6591	0,0000
11	8,8%	0,1421	1,4598	0,0071
12	0,4%	0,0060	1,3554	0,0053
na: no hubo análisis/medición				

Ejemplo 33. Herencia de rasgos en la progenie

5 El cruzamiento se llevó a cabo de la misma forma que en el ejemplo 28, mediante el uso del transformante (LA/919-4-10) obtenido mediante la transferencia del pSPB919 a la variedad de rosa de color violeta claro "Lavande" como progenitor de polen y a la variedad de rosa "Black Baccara" no recombinante como progenitora madre. El fruto se recolectó en el 100° día después de la polinización. La producción de semillas se logró en primer lugar mediante el pelado del fruto, la recolección del aquenio, el pelado del aquenio y luego la extracción de la célula germinativa y su colocación en un papel de filtro humedecido en un plato. El agua utilizada para la producción de semillas fue agua esterilizada que contenía 1 ml/l PPM™ (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology, Inc.) y 50 mg/l kanamicina y las plántulas se cultivaron 10 mediante el enmacetamiento únicamente de las plantas con brotes.

La acumulación de delphinidina se confirmó en las 18 progenies transformantes cuyo pigmento se analizó. El contenido de delphinidina fue de un 99,8% como máximo (promedio: 98,7%).

TABLA 37

No. de Planta	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)
1	97,8%	0,6633	0,0142	0,0009
2	99,0%	0,9002	0,0096	na
3	98,5%	0,5385	0,0080	na
4	99,5%	2,0561	0,0087	0,0016
5	99,8%	1,6556	0,0034	na
6	96,6%	0,5601	0,0200	na
7	99,0%	0,6148	0,0063	na
8	98,9%	1,6867	0,0193	na
9	95,0%	0,5740	0,0304	na
10	96,9%	0,1152	0,0036	na
11	99,3%	0,0683	0,0005	na

12	99,6%	0,1248	0,0005	na
13	99,5%	0,3574	0,0010	0,0000
14	99,6%	0,5500	0,0021	na
15	99,6%	1,2322	0,0049	na
16	99,7%	1,4384	0,0042	na
17	99,8%	0,5117	0,0010	na
18	98,3%	0,8073	0,0140	na
na: no hubo análisis/medición				

Ejemplo 34. Expresión del gen F35'H (#40) del pensamiento y supresión del gen F3'H endógeno de la rosa en WKS77

5 El plásmido pSPB1106 (FIG. 10) se transfirió a la variedad de rosa de color rojo-púrpura oscuro "WKS77" y se obtuvieron 40 transformantes. La acumulación de delfinidina se confirmó en las 26 plantas cuyo pigmento se analizó. El contenido de delfinidina fue de un 80,0% como máximo (promedio: 30,5%). El color de la flor experimentó una alteración significativa del 57a de la tabla de colores de la RHS (grupo rojo-púrpura) al 83d (grupo violeta).

TABLA 38

No. de Planta	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	68,7%	0,5497	0,2275	0,0241	na	na	na
2	78,8%	0,3449	0,0830	0,0096	na	na	na
3	80,0%	0,6949	0,1604	0,0144	na	na	na
4	71,2%	0,4377	0,1563	0,0214	na	na	na
5	72,7%	0,5260	0,1715	0,0266	0,3812	0,2275	1,7669
6	70,7%	0,3829	0,1449	0,0146	na	na	na
7	10,3%	0,0358	0,3031	0,0071	na	na	na
8	15,6%	0,1847	0,9530	0,0444	na	na	na
9	4,8%	0,0739	1,4586	0,0149	na	na	na
10	1,1%	0,0114	1,0411	0,0144	na	na	na
11	54,0%	1,3206	1,1166	0,0092	na	na	na
12	57,8%	0,8842	0,6410	0,0056	na	na	na
13	0,9%	0,0242	2,5500	0,0168	na	na	na
14	23,0%	0,2087	0,6909	0,0062	na	na	na
15	12,7%	0,1645	1,1271	0,0058	na	na	na
16	26,4%	0,5275	1,4645	0,0132	na	na	na
17	18,7%	0,3555	1,5310	0,0109	na	na	na
18	24,2%	0,4388	1,3687	0,0072	na	na	na

19	64,7%	0,4029	0,1945	0,0249	0,6368	0,3949	2,0567
20	0,1%	0,0021	1,8646	0,0077	na	na	na
21	0,0%	0,0000	0,9708	0,0062	na	na	na
22	0,1%	0,0022	2,6049	0,0127	na	na	na
23	0,4%	0,0066	1,8002	0,0066	na	na	na
24	0,5%	0,0079	1,4670	0,0056	0,0000	1,3096	0,2414
25	17,3%	0,1000	0,4671	0,0099	na	na	na
26	18,3%	0,1232	0,5418	0,0052	na	na	na
na: no hubo análisis/medición							

Ejemplo 35. Expresión del gen F3'H (#40) del pensamiento y supresión del gen F3'H endógeno de la rosa en Lavande

El plásmido pSPB1106 se transfirió a la variedad de rosa de color violeta claro "Lavande" y se obtuvieron 40 transformantes. La acumulación de delphinidina se confirmó en 23 de las 25 plantas cuyo pigmento se analizó. El contenido de delphinidina fue de un 98,3% como máximo (promedio: 46,9%).

5

TABLA 39

No. de Planta	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	76,8%	0,0732	0,0188	0,0032	0,5705	0,1595	0,3073
2	80,1%	0,1441	0,0296	0,0061	0,5298	0,1881	4,3294
3	3,7%	0,0086	0,2174	0,0027	na	na	na
4	4,4%	0,0079	0,1691	0,0034	na	na	na
5	8,8%	0,0158	0,1557	0,0070	na	na	na
6	39,0%	0,0212	0,0128	0,0204	0,0000	0,0363	1,3107
7	44,4%	0,0089	0,0027	0,0084	0,0756	0,0573	1,3689
8	40,4%	0,0165	0,0071	0,0172	0,0365	0,0592	2,5211
9	42,0%	0,0087	0,0036	0,0084	0,0752	0,0596	1,2661
10	13,5%	0,0153	0,0939	0,0040	0,1288	1,0594	0,5440
11	81,6%	0,2252	0,0447	0,0061	0,3947	0,1401	0,3947
12	78,8%	0,1022	0,0239	0,0036	0,6700	0,2137	0,5847
13	81,7%	0,2125	0,0438	0,0036	1,3616	0,4621	0,7478
14	80,9%	0,1829	0,0388	0,0044	0,4100	0,2405	0,0567
15	70,9%	0,0664	0,0204	0,0069	0,4230	0,1221	0,1788
16	0,0%	0,0000	0,0844	0,0000	na	na	na
17	98,0%	0,2363	0,0048	0,0000	0,0000	1,0613	0,2698
18	98,3%	0,1398	0,0025	0,0000	0,0479	0,7060	0,1299

No. de Planta	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
19	4,2%	0,0078	0,1724	0,0040	0,0000	0,8627	0,2075
20	0,0%	0 ,0000	0,1696	0,0043	na	na	na
21	60,0%	0,0333	0,0115	0,0107	0,0000	0,0740	1,8678
22	14,3%	0,0091	0,0454	0,0088	0,1096	0,530 5	0,6453
23	15,1%	0 ,0082	0,0408	0,0053	na	na	na
24	17,6%	0,0082	0,0324	0,0059	na	na	na
25	24,4%	0,0147	0, 0375	0,0080	0,0000	0,2147	0, 9765
na: no hubo análisis/medición							

Estos resultados demuestran que el gen exógeno transferido se heredó y expresó en la progenie y que el rasgo de la producción de delphinidina que no se encuentra en los pétalos de rosas comunes se expresó con éxito en la progenie de rosa. Por tanto, este gen puede utilizarse para el cultivo por cruzamiento de rosas con alteración en su color para crear rosas con nuevos colores, incluidos el azul y el púrpura.

5 **Aplicabilidad industrial**

Mediante la supresión artificial de la función de la vía metabólica endógena como, por ejemplo, la expresión de la dihidroflavonol reductasa, en la rosa, y la expresión del gen que codifica la flavonoide 35' -hidroxilasa del pensamiento y el gen que codifica la dihidroflavonol reductasa de especies diferentes a la rosa, es posible crear rosas de color azul a violeta. Estos genes son heredados por las generaciones posteriores y el rasgo de la rosa azul puede utilizarse para el cruzamiento.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110>International Flower Developments Proprietary Limited
 <120>Proceso para la producción de una rosa de color alterado
 <130>P835
 <160>21
 <210>1
 <211>1662
 <212>ADN
 <213>Pensamiento
 <220>
 <223>Codificación de secuencia de nucleótidos de F3'5'H #18 de pensamiento
 <400>1

gaattcggca cgagagccaa t atg gca att cca gtc act gac ctt gct gtc	51
Met Ala Ile Pro Val Thr Asp Leu Ala Val	
1 5 10	
gcg gtt atc ctt ttc ttg atc act cgc ttc cta gtt cgt tct ctt ttc	99
Ala Val Ile Leu Phe Leu Ile Thr Arg Phe Leu Val Arg Ser Leu Phe	
15 20 25	
aag aaa cca acc gga ccg ctc ccg ccg ggt cct tca ggc tgg ccc ttg	147
Lys Lys Pro Thr Gly Pro Leu Pro Pro Gly Pro Ser Gly Trp Pro Leu	
30 35 40	
gtg ggc gcg ctc cct ctc cta ggc gcc atg cct cac gtc aca cta gcc	195
Val Gly Ala Leu Pro Leu Leu Gly Ala Met Pro His Val Thr Leu Ala	
45 50 55	
aac ctc gct aaa aaa tac ggt ccg atc atg tac cta aaa atg ggc acg	243
Asn Leu Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Ile Met Tyr Leu Lys Met Gly Thr	
60 65 70	
tgc gac atg gtg gtc gcg tcc act ccc gac tcg gct cga gcc ttc ctc	291
Cys Asp Met Val Val Ala Ser Thr Pro Asp Ser Ala Arg Ala Phe Leu	
75 80 85 90	
aaa acc cta gac ctc aac ttc tcc gac cgc ccg ccc aac gcc ggc gcc	339
Lys Thr Leu Asp Leu Asn Phe Ser Asp Arg Pro Pro Asn Ala Gly Ala	
95 100 105	
acc cat ttg gcg tac ggc gcg cag gac ttg gtc ttc gcg aag tac ggt	387
Thr His Leu Ala Tyr Gly Ala Gln Asp Leu Val Phe Ala Lys Tyr Gly	
110 115 120	

cca agg tgg aag acc cta aga aaa ttg agc aac ctc cac atg cta ggc	435
Pro Arg Trp Lys Thr Leu Arg Lys Leu Ser Asn Leu His Met Leu Gly	
125 130 135	
ggg aag gcg ctg gac gat tgg gct cac gtg agg gct aac gag cta ggc	483
Gly Lys Ala Leu Asp Asp Trp Ala His Val Arg Ala Asn Glu Leu Gly	
140 145 150	
cac atg ctt aac gcc atg tgc gag gcg agc cgg tgc gga gag ccc gtg	531
His Met Leu Asn Ala Met Cys Glu Ala Ser Arg Cys Gly Glu Pro Val	
155 160 165 170	
gtg ctg gcc gag atg ctc acg tac gcc atg gcc aac atg atc ggt caa	579
Val Leu Ala Glu Met Leu Thr Tyr Ala Met Ala Asn Met Ile Gly Gln	
175 180 185	
gtg ata ctg agt cgg cgc gtg ttc gtc acc aaa ggg aca gag tgc aac	627
Val Ile Leu Ser Arg Arg Val Phe Val Thr Lys Gly Thr Glu Ser Asn	
190 195 200	
gag ttc aaa gat atg gtg gtc gag ttg atg act tcc gcg ggg tat ttc	675
Glu Phe Lys Asp Met Val Val Glu Leu Met Thr Ser Ala Gly Tyr Phe	
205 210 215	
aac att ggt gac ttc ata ccg tgc att gct tgg atg gat ttg caa ggg	723
Asn Ile Gly Asp Phe Ile Pro Ser Ile Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly	
220 225 230	
atc gag cga ggg atg aag aaa ttg cac acg aaa ttc gat gtt ttg ttg	771
Ile Glu Arg Gly Met Lys Lys Leu His Thr Lys Phe Asp Val Leu Leu	
235 240 245 250	
acg aag atg atg aag gag cac aga gcg acg agt cat gag cgc gaa ggg	819
Thr Lys Met Met Lys Glu His Arg Ala Thr Ser His Glu Arg Glu Gly	
255 260 265	
aaa tgc gat ttc ctc gac gtc ctc ttg gaa gaa tgc gag aat aca aat	867
Lys Ser Asp Phe Leu Asp Val Leu Leu Glu Glu Cys Glu Asn Thr Asn	
270 275 280	
ggc gag aag ctt aat gtt acc aac gtc aaa gct gtc ctc ttg aac tta	915
Gly Glu Lys Leu Asn Val Thr Asn Val Lys Ala Val Leu Leu Asn Leu	
285 290 295	
ttc acg gcg ggt acg gac aca tct tca agc ata atc gaa tgg gcg tta	963
Phe Thr Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ser Ile Ile Glu Trp Ala Leu	
300 305 310	


```

tgagctgatg ggctgggacct gagcccaaac atattgggtg tgttttatct gtaattttta 1599
atattataaa gttcgttaatt ttgtatttat ggtaaattat gagttaaaaa aaaaaaaaaa 1659
aaa 1662
<210>2
<211>506
<212>PRT
<213>Pensamiento
<220>
<223>Secuencia de aminoácidos de F3'5'H #18 de pensamiento
<400>2
Met Ala Ile Pro Val Thr Asp Leu Ala Val Ala Val Ile Leu Phe Leu
  1           5           10           15
Ile Thr Arg Phe Leu Val Arg Ser Leu Phe Lys Lys Pro Thr Gly Pro
           20           25           30
Leu Pro Pro Gly Pro Ser Gly Trp Pro Leu Val Gly Ala Leu Pro Leu
           35           40           45
Leu Gly Ala Met Pro His Val Thr Leu Ala Asn Leu Ala Lys Lys Tyr
           50           55           60
Gly Pro Ile Met Tyr Leu Lys Met Gly Thr Cys Asp Met Val Val Ala
           65           70           75           80
Ser Thr Pro Asp Ser Ala Arg Ala Phe Leu Lys Thr Leu Asp Leu Asn
           85           90           95
Phe Ser Asp Arg Pro Pro Asn Ala Gly Ala Thr His Leu Ala Tyr Gly
           100          105          110
Ala Gln Asp Leu Val Phe Ala Lys Tyr Gly Pro Arg Trp Lys Thr Leu
           115          120          125
Arg Lys Leu Ser Asn Leu His Met Leu Gly Gly Lys Ala Leu Asp Asp
           130          135          140
Trp Ala His Val Arg Ala Asn Glu Leu Gly His Met Leu Asn Ala Met
           145          150          155          160
Cys Glu Ala Ser Arg Cys Gly Glu Pro Val Val Leu Ala Glu Met Leu
           165          170          175
Thr Tyr Ala Met Ala Asn Met Ile Gly Gln Val Ile Leu Ser Arg Arg
           180          185          190
Val Phe Val Thr Lys Gly Thr Glu Ser Asn Glu Phe Lys Asp Met Val
           195          200          205

```

Val Glu Leu Met Thr Ser Ala Gly Tyr Phe Asn Ile Gly Asp Phe Ile
 210 215 220
 Pro Ser Ile Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly Ile Glu Arg Gly Met Lys
 225 230 235 240
 Lys Leu His Thr Lys Phe Asp Val Leu Leu Thr Lys Met Met Lys Glu
 245 250 255
 His Arg Ala Thr Ser His Glu Arg Glu Gly Lys Ser Asp Phe Leu Asp
 260 265 270
 Val Leu Leu Glu Glu Cys Glu Asn Thr Asn Gly Glu Lys Leu Asn Val
 275 280 285
 Thr Asn Val Lys Ala Val Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp
 290 295 300
 Thr Ser Ser Ser Ile Ile Glu Trp Ala Leu Thr Glu Met Met Lys Asn
 305 310 315 320
 Pro Thr Ile Leu Lys Lys Thr Gln Glu Glu Met Asp Arg Val Ile Gly
 325 330 335
 Arg Asp Arg Arg Leu Leu Glu Ser Asp Val Ser Lys Leu Pro Tyr Leu
 340 345 350
 Gln Ala Ile Ala Lys Glu Thr Tyr Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu
 355 360 365
 Asn Leu Pro Arg Ile Ala Ile Gln Ala Cys Glu Val Asp Gly Tyr Tyr
 370 375 380
 Ile Pro Lys Asp Thr Arg Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg
 385 390 395 400
 Asp Pro Ser Val Trp Glu Asn Pro Ser Glu Phe Ser Pro Glu Arg Phe
 405 410 415
 Leu Ser Glu Glu Asn Gly Lys Ile Ser Pro Gly Gly Asn Asp Phe Glu
 420 425 430
 Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Thr Arg Met
 435 440 445
 Gly Met Val Leu Val Ser Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His Ser Phe
 450 455 460
 Asp Trp Lys Leu Pro Asn Gly Val Ser Glu Ile Asn Met Asp Glu Ser
 465 470 475 480
 Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Ser Ala Thr Val Ser
 485 490 495

Pro Arg Leu Ala Pro Ser Ala Tyr Val Ile

500

505

<210>3

<211>1795

<212>ADN

<213>Pensamiento

<220>

<223>Codificación de secuencia de nucleótidos de F3'5'H #40 de pensamiento

<400>3

gaattcggca cgaggacaac atg gca att cta gtc acc gac ttc gtt gtc	50
Met Ala Ile Leu Val Thr Asp Phe Val Val	
1 5 10	
gcg gct ata att ttc ttg atc act cgg ttc tta gtt cgt tct ctt ttc	98
Ala Ala Ile Ile Phe Leu Ile Thr Arg Phe Leu Val Arg Ser Leu Phe	
15 20 25	
aag aaa cca acc cga ccg ctc ccc ccg ggt cct ctc ggt tgg ccc ttg	146
Lys Lys Pro Thr Arg Pro Leu Pro Pro Gly Pro Leu Gly Trp Pro Leu	
30 35 40	
gtg ggc gcc ctc cct ctc cta ggc gcc atg cct cac gtc gca cta gcc	194
Val Gly Ala Leu Pro Leu Leu Gly Ala Met Pro His Val Ala Leu Ala	
45 50 55	
aaa ctc gct aag aag tat ggt ccg atc atg cac cta aaa atg ggc acg	242
Lys Leu Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Ile Met His Leu Lys Met Gly Thr	
60 65 70	
tgc gac atg gtg gtc gcg tcc acc ccc gag tcg gct cga gcc ttc ctc	290
Cys Asp Met Val Val Ala Ser Thr Pro Glu Ser Ala Arg Ala Phe Leu	
75 80 85 90	
aaa acg cta gac ctc aac ttc tcc aac cgn cca ccc aac gcg ggc gca	338
Lys Thr Leu Asp Leu Asn Phe Ser Asn Arg Pro Pro Asn Ala Gly Ala	
95 100 105	
tcc cac cta gcg tac ggc gcg cag gac tta gtc ttc gcc aag tac ggt	386
Ser His Leu Ala Tyr Gly Ala Gln Asp Leu Val Phe Ala Lys Tyr Gly	
110 115 120	
ccg agg tgg aag act tta aga aaa ttg agc aac ctc cac atg cta ggc	434
Pro Arg Trp Lys Thr Leu Arg Lys Leu Ser Asn Leu His Met Leu Gly	
125 130 135	

ggg aag gcg ttg gat gat tgg gca aat gtg agg gtc acc gag cta ggc	482
Gly Lys Ala Leu Asp Asp Trp Ala Asn Val Arg Val Thr Glu Leu Gly	
140 145 150	
cac atg ctt aaa gcc atg tgc gag gcg agc cgg tgc ggg gag ccc gtg	530
His Met Leu Lys Ala Met Cys Glu Ala Ser Arg Cys Gly Glu Pro Val	
155 160 165 170	
gtg ctg gcc gag atg ctc acg tac gcc atg gcg aac atg atc ggt caa	578
Val Leu Ala Glu Met Leu Thr Tyr Ala Met Ala Asn Met Ile Gly Gln	
175 180 180	
gtg ata ctc agc cgg cgc gtg ttc gtg acc aaa ggg acc gag tct aac	626
Val Ile Leu Ser Arg Arg Val Phe Val Thr Lys Gly Thr Glu Ser Asn	
185 190 195	
gag ttc aaa gac atg gtg gtc gag ttg atg acg tcc gcc ggg tac ttc	674
Glu Phe Lys Asp Met Val Val Glu Leu Met Thr Ser Ala Gly Tyr Phe	
200 205 210	
aac atc ggt gac ttc ata ccc tcg atc gct tgg atg gat ttg caa ggg	722
Asn Ile Gly Asp Phe Ile Pro Ser Ile Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly	
215 220 225	
atc gag cga ggg atg aag aag ctg cac acg aag ttt gat gtg tta ttg	770
Ile Glu Arg Gly Met Lys Lys Leu His Thr Lys Phe Asp Val Leu Leu	
230 235 240 245	
acg aag atg gtg aag gag cat aga gcg acg agt cat gag cgc aaa ggg	818
Thr Lys Met Val Lys Glu His Arg Ala Thr Ser His Glu Arg Lys Gly	
250 255 260	
aag gca gat ttc ctc gac gtt ctc ttg gaa gaa tgc gac aat aca aat	866
Lys Ala Asp Phe Leu Asp Val Leu Leu Glu Glu Cys Asp Asn Thr Asn	
265 270 275	
ggg gag aag ctt agt att acc aat atc aaa gct gtc ctt ttg aat cta	914
Gly Glu Lys Leu Ser Ile Thr Asn Ile Lys Ala Val Leu Leu Asn Leu	
280 285 290	
ttc acg gcg ggc acg gac aca tct tcg agc ata atc gaa tgg gcg tta	962
Phe Thr Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ser Ile Ile Glu Trp Ala Leu	
295 300 305	
acg gag atg atc aag aat ccg acg atc tta aaa aag gcg caa gag gag	1010
Thr Glu Met Ile Lys Asn Pro Thr Ile Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu	
310 315 320 325	

ES 2 370 175 T3

atg gat cga gtc atc ggt cgt gat cgg agg ctg ctc gaa tcg gac ata	1058
Met Asp Arg Val Ile Gly Arg Asp Arg Arg Leu Leu Glu Ser Asp Ile	
330 335 340	
tcg agc ctc ccg tac cta caa gcc att gct aaa gaa acg tat cgc aaa	1106
Ser Ser Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Ile Ala Lys Glu Thr Tyr Arg Lys	
345 350 355	
cac ccg tcg acg cct ctc aac ttg ccg agg att gcg atc caa gca tgt	1154
His Pro Ser Thr Pro Leu Asn Leu Pro Arg Ile Ala Ile Gln Ala Cys	
360 365 370	
gaa gtt gat ggc tac tac atc cct aag gac gcg agg ctt agc gtg aac	1202
Glu Val Asp Gly Tyr Tyr Ile Pro Lys Asp Ala Arg Leu Ser Val Asn	
375 380 385	
att tgg gcg atc ggt cgg gac ccg aat gtt tgg gag aat ccg ttg gag	1250
Ile Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asn Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu	
390 395 400 405	
ttc ttg ccg gaa aga ttc ttg tct gaa gag aat ggg aag atc aat ccc	1298
Phe Leu Pro Glu Arg Phe Leu Ser Glu Glu Asn Gly Lys Ile Asn Pro	
410 415 420	
ggt ggg aat gat ttt aag ctg att ccg ttt gga gcc ggg agg aga att	1346
Gly Gly Asn Asp Phe Lys Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile	
425 430 435	
tgt gcg ggg aca agg atg gga atg gtc ctt gta agt tat att ttg ggc	1394
Cys Ala Gly Thr Arg Met Gly Met Val Leu Val Ser Tyr Ile Leu Gly	
440 445 450	
act ttg gtc cat tct ttt gat tgg aaa tta cca aat ggt gtc gct gag	1442
Thr Leu Val His Ser Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asn Gly Val Ala Glu	
455 460 465	
ctt aat atg gat gaa agt ttt ggg ctt gca ttg caa aag gcc gtg ccg	1490
Leu Asn Met Asp Glu Ser Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro	
470 475 480 485	
ctc tcg gcc ttg gtc agc cca cgg ttg gcc tca aac ccg tac gca acc	1538
Leu Ser Ala Leu Val Ser Pro Arg Leu Ala Ser Asn Pro Tyr Ala Thr	
490 495 500	
tgagctaalg ggctggccct agttttgtgg gcctaattt agagactttt gtgttitaag	1598
gltgtacttt tattaattgg gtgcttaaat gtgtgtttta atttgtattt atggtaatt	1658
atgactttat tglataatta tttatttttc ccttctgggt attttatcca ttttaatttt	1718

cttcagaatt atgatcatag ttatcagaat aaaattgaaa ataatgaatc ggaaaaaaaa 1778
 aaaaaaaaaa aaaaaaa 1798

<210>4

<211>501

<212>PRT

<213>Pensamiento

<220>

<223>Secuencia de aminoácidos de F3'5'H #40 de pensamiento

<400>4

Met	Ala	Ile	Leu	Val	Thr	Asp	Phe	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Leu
1				5					10					15	
Ile	Thr	Arg	Phe	Leu	Val	Arg	Ser	Leu	Phe	Lys	Lys	Pro	Thr	Arg	Pro
			20					25					30		
Leu	Pro	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Trp	Pro	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Pro	Leu
			35				40					45			
Leu	Gly	Ala	Met	Pro	His	Val	Ala	Leu	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Lys	Tyr
	50					55				60					
Gly	Pro	Ile	Met	His	Leu	Lys	Met	Gly	Thr	Cys	Asp	Met	Val	Val	Ala
65					70					75					80
Ser	Thr	Pro	Glu	Ser	Ala	Arg	Ala	Phe	Leu	Lys	Thr	Leu	Asp	Leu	Asn
				85					90					95	
Phe	Ser	Asn	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Gly	Ala	Ser	His	Leu	Ala	Tyr	Gly
				100					105					110	
Ala	Gln	Asp	Leu	Val	Phe	Ala	Lys	Tyr	Gly	Pro	Arg	Trp	Lys	Thr	Leu
			115					120					125		
Arg	Lys	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Met	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Leu	Asp	Asp
						135					140				
Trp	Ala	Asn	Val	Arg	Val	Thr	Glu	Leu	Gly	His	Met	Leu	Lys	Ala	Met
145					150						155				160
Cys	Glu	Ala	Ser	Arg	Cys	Gly	Glu	Pro	Val	Val	Leu	Ala	Glu	Met	Leu
				165						170				175	
Thr	Tyr	Ala	Met	Ala	Asn	Met	Ile	Gly	Gln	Val	Ile	Leu	Ser	Arg	Arg
			180						180					185	
Val	Phe	Val	Thr	Lys	Gly	Thr	Glu	Ser	Asn	Glu	Phe	Lys	Asp	Met	Val
			190						195				200		
Val	Glu	Leu	Met	Thr	Ser	Ala	Gly	Tyr	Phe	Asn	Ile	Gly	Asp	Phe	Ile

205		210		215
Pro Ser Ile Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly Ile Glu Arg Gly Met Lys				
220		225		235
Lys Leu His Thr Lys Phe Asp Val Leu Leu Thr Lys Met Val Lys Glu				
	240		245	250
His Arg Ala Thr Ser His Glu Arg Lys Gly Lys Ala Asp Phe Leu Asp				
	255		260	265
Val Leu Leu Glu Glu Cys Asp Asn Thr Asn Gly Glu Lys Leu Ser Ile				
	270		275	280
Thr Asn Ile Lys Ala Val Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp				
	285		290	295
Thr Ser Ser Ser Ile Ile Glu Trp Ala Leu Thr Glu Met Ile Lys Asn				
300		305		310
Pro Thr Ile Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Met Asp Arg Val Ile Gly				
	320		325	330
Arg Asp Arg Arg Leu Leu Glu Ser Asp Ile Ser Ser Leu Pro Tyr Leu				
	335		340	345
Gln Ala Ile Ala Lys Glu Thr Tyr Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu				
	350		355	360
Asn Leu Pro Arg Ile Ala Ile Gln Ala Cys Glu Val Asp Gly Tyr Tyr				
	365		370	375
Ile Pro Lys Asp Ala Arg Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg				
380		385		390
Asp Pro Asn Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Leu Pro Glu Arg Phe				
	400		405	410
Leu Ser Glu Glu Asn Gly Lys Ile Asn Pro Gly Gly Asn Asp Phe Lys				
	415		420	425
Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Thr Arg Met				
	430		435	440
Gly Met Val Leu Val Ser Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His Ser Phe				
	445		450	455
Asp Trp Lys Leu Pro Asn Gly Val Ala Glu Leu Asn Met Asp Glu Ser				
460		465		475
Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Ser Ala Leu Val Ser				
	480		485	490
Pro Arg Leu Ala Ser Asn Pro Tyr Ala Thr				

495

500

<210>5

<211>1474

<212>ADN

<213>Rosa

<220>

<223>codificación de secuencia de nucleótidos de chalcona sintasa de rosa

<400>5

ggagataatca	aatggtgac	cgtcgaggaa	giccgcaagg	cicaacgcgc	tgagggtccg	60
gtaccggtc	tggccatcgg	gacagcaact	ccicccaact	gtattgacca	gagcacatac	120
cccgaactact	acttccglat	cactaagagc	gagcacaagg	ctgagctcaa	ggagaaattc	180
cagcgcgatgt	gtgacaaatc	taigtatcaag	aagcgctaca	tgtacttgac	cgaagaaatt	240
cttaaggaga	atcctagtat	gtgtgagtac	atggccctt	cacttgatgc	aagacaagat	300
atgggtggtt	ttgaaattcc	aaagcttggg	aaagaggctg	ccactaaggc	tattaaggaa	360
tggggtcagc	ccaagtccaa	aatcacccac	ttggctttt	gtaccactag	tggcgtcgac	420
atgcccgggg	ccgattacca	gtcactaag	ctcttaggcc	tccgcccgtc	cgtgaagcgt	480
ctcatgatgt	accaacaagg	gtgtttcgcc	ggaggcacgg	tgctccggtt	ggctaaaggac	540
ttggccgaga	acaacaagg	tgacaggtt	cttgttgtt	gctcagagat	cactgcccgt	600
actttccgtg	ggcctagcga	cacccatctc	gatagtctg	tgggccaagc	cttgttccgt	660
gatgggtgctg	cggccattat	tgttggggcc	gacccattgc	ccgagggtga	gaagccttcg	720
ttcgagttgg	tcicggcagc	ccaaactatc	cttccigaca	gtgacggagc	catcgacggg	ADN
catcttcgtg	aagttgggct	cacattcac	ctccicaaag	atgttcccgg	gctgatttca	840
aagaacatcg	agaagagcct	caacgaggcc	ttcaaaccit	tgaacatcac	agactggaac	900
tcacttttct	ggattgcaca	cccgggtggc	ccigtcaatt	tagaccaagt	agaggctaaa	960
ttgggcctga	agccccgaaa	gttagaagcc	acaaggcata	tattatccga	gtacggcaat	1020
atgtctagt	cttgttgtt	gtttatittg	gacgagggtc	ggagaaagtc	tgcagctaat	1080
gggcacaaga	ccactggaga	aggccaggag	tggggtgtcc	tatttggttt	tgggccaggg	1140
ctcaccgtcg	agaccgtcgt	gttcacagt	gtggctgctt	aaacttgaag	gcatctgggt	1200
tcacttgagt	gatctgctcc	tggatttgtt	cttatatatg	tatcgtttcc	actctacttt	1260
ccttgttaga	tttcttttt	tggatttatt	tttctggiga	atttagcaat	atatgtaatg	1320
atgaataata	ttattccaca	aatttcatac	gagcaaaagt	tcctgcaata	atttagttag	1380
aagttgactt	tccggaagat	ttagagcggg	gaatatact	cccactagct	gaaagattat	1440
ccggggatag	agtacgttca	aaaaaaaaaa	aaaa			1474

<210>6

<211>420

<212>ADN

<213>Rosa

<220>

<223>Codificación de secuencia de nucleótidos de parte de antocianidina sintasa de rosa

<400>6

gaagaagggg	ggctggagaa	ggaggtcggg	ggactcgaag	aactcgtcct	gcaaatgaaa	60
atcaactact	acccaaaatg	ccctcagccg	gaacttgccc	tcggcgtgga	agccccacacc	120
gacataagtg	cactcacctt	catcctccac	aacatgggtc	ccggcctgca	gctctttctac	180
ggcggcaaat	gggtgacagc	gaaatgcgtg	cccaactcca	tcgtcatgca	catcggcggac	240
aacttggaga	ttctgagcaa	cggcaagtac	aagagcattt	ttcacagggg	ggattgtcaa	300
caagggagaa	ggtgaggttc	tcgttggcgg	ttttcttgia	gccacccagg	aggaggtcat	360
tctcaagccg	ttgcgacgac	tgtctcgagg	aggaaccgcg	tcttccaccc	gacttttcgg	420

<210>7

<211>1808

<212>ADN

<213>Torenia

<220>

<223>Codificación de secuencia de nucleótidos de antocianina acil transferasa de Torenia

<400>7

cttcaaagcc	aaaaagaaac	aattaatca	atg gct gtt gaa gcc ccc aaa aca	53
			Met Ala Val Glu Ala Pro Lys Thr	
			1 5	
ata tgt gca gtc ctc gaa aac tct ctt att aca cca caa agt acc gat	101			
Ile Cys Ala Val Leu Glu Asn Ser Leu Ile Thr Pro Gln Ser Thr Asp				
	10	15	20	
aca gaa caa act ctt tca ctc aca ttc ttt gac atc aaa tgg gtt cat	149			
Thr Glu Gln Thr Leu Ser Leu Thr Phe Phe Asp Ile Lys Trp Val His				
	25	30	35	40
ttt cat cca atg caa tgc ctt gtg ttg tac aac ttc cca tgt tct aag	197			
Phe His Pro Met Gln Cys Leu Val Leu Tyr Asn Phe Pro Cys Ser Lys				
	45	50	55	
tca cat ttt ctc gaa gcc aca gtt ccg agc ttc aaa tca tca ctc tcc	245			
Ser His Phe Leu Glu Ala Thr Val Pro Ser Phe Lys Ser Ser Leu Ser				
	60	65	70	
aaa act ctc aga cac tat ctt cca tta tca gga aac tta tac tat cca	293			
Lys Thr Leu Arg His Tyr Leu Pro Leu Ser Gly Asn Leu Tyr Tyr Pro				
	75	80	85	

aac ccg acc cat gac atg gat gat gat gaa tcg aac atg ccc gag atc	341
Asn Pro Thr His Asp Met Asp Asp Asp Glu Ser Asn Met Pro Glu Ile	
90 95 100	
cgt tat aaa cct ggc gac tcg gtt tct cta acc gtt gca gag tac ttc	389
Arg Tyr Lys Pro Gly Asp Ser Val Ser Leu Thr Val Ala Glu Tyr Phe	
105 110 115 120	
tcc ggt cat gaa gac aat acg act act gaa gaa tac ttc aat tac ctc	437
Ser Gly His Glu Asp Asn Thr Thr Thr Glu Glu Tyr Phe Asn Tyr Leu	
125 130 135	
act gga aat ttc cag aga gat tgc gat caa ttc tat gat ctc tta ccc	485
Thr Gly Asn Phe Gln Arg Asp Cys Asp Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Pro	
140 145 150	
gat ttt cga gac ccg gaa acc gaa tcc aat tgc aca gta atc cca ctt	533
Asp Phe Arg Asp Pro Glu Thr Glu Ser Asn Cys Thr Val Ile Pro Leu	
155 160 165	
ata gca gtt caa atc aca ctc ttt cca ggt gct ggg ata tgt ctg egg	581
Ile Ala Val Gln Ile Thr Leu Phe Pro Gly Ala Gly Ile Cys Leu Gly	
170 175 180	
gtc atc aac agt cac gta gtt ggc gat gcg agt tcc ata gtg gga ttc	629
Val Ile Asn Ser His Val Val Gly Asp Ala Ser Ser Ile Val Gly Phe	
185 190 195 200	
atc aaa gct tgg agt aaa gtt gca atg tat gaa gac gat gaa gag att	677
Ile Lys Ala Trp Ser Lys Val Ala Met Tyr Glu Asp Asp Glu Glu Ile	
205 210 215	
cta gct aac aac aat ttg att cca tct tat gac aga tca gtc gtg aaa	725
Leu Ala Asn Asn Asn Leu Ile Pro Ser Tyr Asp Arg Ser Val Val Lys	
220 225 230	
gat cca aaa ggg atc aaa tct ttg ctc tgg aac aag atg aag aac gtg	773
Asp Pro Lys Gly Ile Lys Ser Leu Leu Trp Asn Lys Met Lys Asn Val	
235 240 245	
aaa tat caa ccc caa ccc gca aaa cat ctc cca aca aac aag gtc cga	821
Lys Tyr Gln Pro Gln Pro Ala Lys His Leu Pro Thr Asn Lys Val Arg	
250 255 260	
gcc aca tac acc ttg aga aag aac gat atc gag agg ctg aaa acc cga	869
Ala Thr Tyr Thr Leu Arg Lys Asn Asp Ile Glu Arg Leu Lys Thr Arg	
265 270 275 280	

atc cga tcc aag aaa cca ggc aca acc tgc tta tca tct ttc aca atc	917
Ile Arg Ser Lys Lys Pro Gly Thr Thr Cys Leu Ser Ser Phe Thr Ile	
285 290 295	
gca aca gcc tat gct tgg aca tgc ctt gca aaa tct gca gca gaa gct	965
Ala Thr Ala Tyr Ala Trp Thr Cys Leu Ala Lys Ser Ala Ala Glu Ala	
300 305 310	
gaa gaa caa gta gtc caa gac agt gac gac gag cac ttg ctc atg ccc	1013
Glu Glu Gln Val Val Gln Asp Ser Asp Asp Glu His Leu Leu Met Pro	
315 320 325	
gtt gat ttg aga cca aga ata gat cct cca tta cca cct tct tac ttt	1061
Val Asp Leu Arg Pro Arg Ile Asp Pro Pro Leu Pro Pro Ser Tyr Phe	
330 335 340	
gga aac tgc gtt ctt cca tct ttt gcg aaa acg acg cat ggg ctt ttg	1109
Gly Asn Cys Val Leu Pro Ser Phe Ala Lys Thr Thr His Gly Leu Leu	
345 350 355 360	
aaa gga gag tta ggg ctt ttt aat gca gtg gaa gtg att agt gat gtc	1157
Lys Gly Glu Leu Gly Leu Phe Asn Ala Val Glu Val Ile Ser Asp Val	
365 370 375	
att acc ggt atc gtt agc aag aaa tat gac ttg ttc aaa gac tta gac	1205
Ile Thr Gly Ile Val Ser Lys Lys Tyr Asp Leu Phe Lys Asp Leu Asp	
380 385 390	
aga caa ggt gag att ttt cgt gcc ttg ttc gga aaa cga gtg ttg gcg	1253
Arg Gln Gly Glu Ile Phe Arg Ala Leu Phe Gly Lys Arg Val Leu Ala	
395 400 405	
atc atg ggt tcc cct aag ttc gat ctc tac gaa gtt gat ttc ggg tgg	1301
Ile Met Gly Ser Pro Lys Phe Asp Leu Tyr Glu Val Asp Phe Gly Trp	
410 415 420	
ggt aag ccg aag aag att gaa cct gtg tcc att gat aga gag agg acg	1349
Gly Lys Pro Lys Lys Ile Glu Pro Val Ser Ile Asp Arg Glu Arg Thr	
425 430 435 440	
act atg tgg att agc aag tct ggc gag ttt gag ggt gga ttg gag att	1397
Thr Met Trp Ile Ser Lys Ser Gly Glu Phe Glu Gly Gly Leu Glu Ile	
445 450 455	
ggt ttt tct ttc aat aag aag aaa atg gat gct ttt ggc gag tgt ttt	1445
Gly Phe Ser Phe Asn Lys Lys Lys Met Asp Ala Phe Gly Glu Cys Phe	
460 465 470	

aac agc ggt ttg aag gat att taatttaaaa aattgttttag ctttgatgca 1496
 Asn Ser Gly Leu Lys Asp Ile

475

tgcgtttttat atatgtttgtg aaataatgtg gtgtgcaata actagagtaa ctttaggtta 1556
 ataaattcgg tttttctgtt aaatctggat gattcgtgca agcaaactgt cgatgcgttg 1616
 gatggatgtc ggggtgtgtg gagattgttg aagaaggaaa tggatgcitt ttttatggtg 1676
 gtttgaagga ttgaaatgtg tagattattg gtttattgag gttgtttata tttgtgtatg 1736
 ttgtttatgc atgaaaaata tttagatccc aacattttat giatgacgtg gtttaaatatt 1796
 tcgatttcga tc 1808

<210>8

<211>479

<212>PRT

<213>Torenia

<220>

<223>Secuencia de aminoácidos de antocianina acil transferasa de Torenia

<400>8

Met	Ala	Val	Glu	Ala	Pro	Lys	Thr	Ile	Cys	Ala	Val	Leu	Glu	Asn	Ser
1				5					10					15	
Leu	Ile	Thr	Pro	Gln	Ser	Thr	Asp	Thr	Glu	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr
			20					25					30		
Phe	Phe	Asp	Ile	Lys	Trp	Val	His	Phe	His	Pro	Met	Gln	Cys	Leu	Val
		35					40					45			
Leu	Tyr	Asn	Phe	Pro	Cys	Ser	Lys	Ser	His	Phe	Leu	Glu	Ala	Thr	Val
	50					55					60				
Pro	Ser	Phe	Lys	Ser	Ser	Leu	Ser	Lys	Thr	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Pro
65					70					75				80	
Leu	Ser	Gly	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Pro	Thr	His	Asp	Met	Asp	Asp
				85					90					95	
Asp	Glu	Ser	Asn	Met	Pro	Glu	Ile	Arg	Tyr	Lys	Pro	Gly	Asp	Ser	Val
			100					105					110		
Ser	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Phe	Ser	Gly	His	Glu	Asp	Asn	Thr	Thr
		115					120					125			
Thr	Glu	Glu	Tyr	Phe	Asn	Tyr	Leu	Thr	Gly	Asn	Phe	Gln	Arg	Asp	Cys
	130					135					140				
Asp	Gln	Phe	Tyr	Asp	Leu	Leu	Pro	Asp	Phe	Arg	Asp	Pro	Glu	Thr	Glu
145					150					155					160

Ser Asn Cys Thr Val Ile Pro Leu Ile Ala Val Gln Ile Thr Leu Phe
 165 170 175
 Pro Gly Ala Gly Ile Cys Leu Gly Val Ile Asn Ser His Val Val Gly
 180 185 190
 Asp Ala Ser Ser Ile Val Gly Phe Ile Lys Ala Trp Ser Lys Val Ala
 195 200 205
 Met Tyr Glu Asp Asp Glu Glu Ile Leu Ala Asn Asn Asn Leu Ile Pro
 210 215 220
 Ser Tyr Asp Arg Ser Val Val Lys Asp Pro Lys Gly Ile Lys Ser Leu
 225 230 235 240
 Leu Trp Asn Lys Met Lys Asn Val Lys Tyr Gln Pro Gln Pro Ala Lys
 245 250 255
 His Leu Pro Thr Asn Lys Val Arg Ala Thr Tyr Thr Leu Arg Lys Asn
 260 265 270
 Asp Ile Glu Arg Leu Lys Thr Arg Ile Arg Ser Lys Lys Pro Gly Thr
 275 280 285
 Thr Cys Leu Ser Ser Phe Thr Ile Ala Thr Ala Tyr Ala Trp Thr Cys
 290 295 300
 Leu Ala Lys Ser Ala Ala Glu Ala Glu Glu Gln Val Val Gln Asp Ser
 305 310 315 320
 Asp Asp Glu His Leu Leu Met Pro Val Asp Leu Arg Pro Arg Ile Asp
 325 330 335
 Pro Pro Leu Pro Pro Ser Tyr Phe Gly Asn Cys Val Leu Pro Ser Phe
 340 345 350
 Ala Lys Thr Thr His Gly Leu Leu Lys Gly Glu Leu Gly Leu Phe Asn
 355 360 365
 Ala Val Glu Val Ile Ser Asp Val Ile Thr Gly Ile Val Ser Lys Lys
 370 375 380
 Tyr Asp Leu Phe Lys Asp Leu Asp Arg Gln Gly Glu Ile Phe Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu Phe Gly Lys Arg Val Leu Ala Ile Met Gly Ser Pro Lys Phe Asp
 405 410 415
 Leu Tyr Glu Val Asp Phe Gly Trp Gly Lys Pro Lys Lys Ile Glu Pro
 420 425 430
 Val Ser Ile Asp Arg Glu Arg Thr Thr Met Trp Ile Ser Lys Ser Gly
 435 440 445

Glu Phe Glu Gly Gly Leu Glu Ile Gly Phe Ser Phe Asn Lys Lys Lys
 450 455 460

Met Asp Ala Phe Gly Glu Cys Phe Asn Ser Gly Leu Lys Asp Ile
 465 470 475

<210>9

<211>1252

<212>ADN

<213>Lirio

<220>

<223> Codificación de secuencia de nucleótidos de dihidrofravonol
 reductasa de lirio

<400>9

aaacaatata tcgag atg atg agc ccc gtt gtc gtg acc gga gcg agc ggc	51
Met Met Ser Pro Val Val Val Thr Gly Ala Ser Gly	
1 5 10	
tac gtc ggt tca tgg ctt gtt atg aag ctc ctt cgc gac ggc tac gcc	99
Tyr Val Gly Ser Trp Leu Val Met Lys Leu Leu Arg Asp Gly Tyr Ala	
15 20 25	
gtt cga gcc act gtc aga gac cca acc aat gtg gag aag acg aag ccg	147
Val Arg Ala Thr Val Arg Asp Pro Thr Asn Val Glu Lys Thr Lys Pro	
30 35 40	
ctg ttg gac ctc ccc gga gct gac gcg ctg ctc acc atc tgg aag gca	195
Leu Leu Asp Leu Pro Gly Ala Asp Ala Leu Leu Thr Ile Trp Lys Ala	
45 50 55 60	
gac ctc ggc cag gac gga agc ttc gac aag gcg gtc gca gga tgc acc	243
Asp Leu Gly Gln Asp Gly Ser Phe Asp Lys Ala Val Ala Gly Cys Thr	
65 70 75	
gcg gtc ttc cac gtc gcc acg ccc atg gat ttc gag tcc aag gac cca	291
Ala Val Phe His Val Ala Thr Pro Met Asp Phe Glu Ser Lys Asp Pro	
80 85 90	
gaa aac gag gtg atc aag ccg acc ata aat ggc gtt tta agt atc atg	339
Glu Asn Glu Val Ile Lys Pro Thr Ile Asn Gly Val Leu Ser Ile Met	
95 100 105	
agg tcc tgt aag aag gcc gga acg gtc aaa cgc gtc gtc ttc act tca	387
Arg Ser Cys Lys Lys Ala Gly Thr Val Lys Arg Val Val Phe Thr Ser	
110 115 120	
tcc gcc ggg acg gtg gac gtg aaa gaa cat cag cag acg gag tac gac	435

Ser Ala Gly Thr Val Asp Val Lys Glu His Gln Gln Thr Glu Tyr Asp			
125	130	135	140
gag agc tcg tgg agc gac gtc gac ttc tgc aga cgt gtc aag atg aca	483		
Glu Ser Ser Trp Ser Asp Val Asp Phe Cys Arg Arg Val Lys Met Thr			
145	150	155	
ggc tgg atg tat ttt gtg tcg aag act ctg gcc gag aga gca gcc tgg	531		
Gly Trp Met Tyr Phe Val Ser Lys Thr Leu Ala Glu Arg Ala Ala Trp			
160	165	170	
gaa ttt gca aga gag aat ggc ata gac ttc ata agc atc atc ccc acg	579		
Glu Phe Ala Arg Glu Asn Gly Ile Asp Phe Ile Ser Ile Ile Pro Thr			
175	180	185	
cta gtc gtc ggt cct ttc atc acc aca act atg cca ccc agc atg gtg	627		
Leu Val Val Gly Pro Phe Ile Thr Thr Thr Met Pro Pro Ser Met Val			
190	195	200	
act gcg cta tca ttc atg aca gga aac gaa gca cac tat cac ata atc	675		
Thr Ala Leu Ser Phe Met Thr Gly Asn Glu Ala His Tyr His Ile Ile			
205	210	215	220
aag cac gcg cag ctc gtc cac ctt gac gac ctg tgc gct gcc cac att	723		
Lys His Ala Gln Leu Val His Leu Asp Asp Leu Cys Ala Ala His Ile			
225	230	235	
tac ctc ctg aat cgc ccc gaa gcg aac ggg agg tac ata tgc tca tcg	771		
Tyr Leu Leu Asn Arg Pro Glu Ala Asn Gly Arg Tyr Ile Cys Ser Ser			
240	245	250	
cac gaa gcc acc atc cac gac ctg gcg agg atg gtc agg gag agg cac	819		
His Glu Ala Thr Ile His Asp Leu Ala Arg Met Val Arg Glu Arg His			
255	260	265	
cct tgg tgc ggc tcc ata ccc gaa aag ttc gac ggc atc gag aag gac	867		
Pro Trp Cys Gly Ser Ile Pro Glu Lys Phe Asp Gly Ile Glu Lys Asp			
270	275	280	
gtc aga acc gtg cac ttc tct tcc aag agg ctt ttg gac ctc ggg ttc	915		
Val Arg Thr Val His Phe Ser Ser Lys Arg Leu Leu Asp Leu Gly Phe			
285	290	295	300
gag ttc aag tac acg gtg gaa gaa atg ttc gac gaa gcg ata cgg tcg	963		
Glu Phe Lys Tyr Thr Val Glu Glu Met Phe Asp Glu Ala Ile Arg Ser			
305	310	315	
tgc gtc gag aag aag ctc ata ccc ctc cct gag aat ggc aac gtg gac	1011		

Cys Val Glu Lys Lys Leu Ile Pro Leu Pro Glu Asn Gly Asn Val Asp
 320 325 330
 gca gct gcc ggg gct aaa gac atg gtt cat gga gca gag gaa cat gcc 1059
 Ala Ala Ala Gly Ala Lys Asp Met Val His Gly Ala Glu Glu His Ala
 335 340 345
 cga att gct atg gaa cta gaa cca aaa aaa aag gtc aag tgaatgtga 1108
 Arg Ile Ala Met Glu Leu Glu Pro Lys Lys Lys Val Lys
 350 355 360
 agatacaaca ttttatgcgt atggacatta caatcittaga tgttcaaggt ttcaaattgt 1168
 atcttaagtg tatgatttat gttgacactc ggaagtttca ttgaaattaa taaaaaggga 1228
 ttgctcaaa aaaaaaaaaa aaaa 1252

<210>10

<211>361

<212>PRT

<213>Lirio

<220>

Secuencia de aminoácidos que codifica la dihidrofravonol reductasa de

<223>Lirio

<400>10

Met Met Ser Pro Val Val Val Thr Gly Ala Ser Gly Tyr Val Gly Ser
 1 5 10 15
 Trp Leu Val Met Lys Leu Leu Arg Asp Gly Tyr Ala Val Arg Ala Thr
 20 25 30
 Val Arg Asp Pro Thr Asn Val Glu Lys Thr Lys Pro Leu Leu Asp Leu
 35 40 45
 Pro Gly Ala Asp Ala Leu Leu Thr Ile Trp Lys Ala Asp Leu Gly Gln
 50 55 60
 Asp Gly Ser Phe Asp Lys Ala Val Ala Gly Cys Thr Ala Val Phe His
 65 70 75 80
 Val Ala Thr Pro Met Asp Phe Glu Ser Lys Asp Pro Glu Asn Glu Val
 85 90 95
 Ile Lys Pro Thr Ile Asn Gly Val Leu Ser Ile Met Arg Ser Cys Lys
 100 105 110
 Lys Ala Gly Thr Val Lys Arg Val Val Phe Thr Ser Ser Ala Gly Thr
 115 120 125
 Val Asp Val Lys Glu His Gln Gln Thr Glu Tyr Asp Glu Ser Ser Trp
 130 135 140

Ser Asp Val Asp Phe Cys Arg Arg Val Lys Met Thr Gly Trp Met Tyr
 145 150 155 160
 Phe Val Ser Lys Thr Leu Ala Glu Arg Ala Ala Trp Glu Phe Ala Arg
 165 170 175
 Glu Asn Gly Ile Asp Phe Ile Ser Ile Ile Pro Thr Leu Val Val Gly
 180 185 190
 Pro Phe Ile Thr Thr Thr Met Pro Pro Ser Met Val Thr Ala Leu Ser
 195 200 205
 Phe Met Thr Gly Asn Glu Ala His Tyr His Ile Ile Lys His Ala Gln
 210 215 220
 Leu Val His Leu Asp Asp Leu Cys Ala Ala His Ile Tyr Leu Leu Asn
 225 230 235 240
 Arg Pro Glu Ala Asn Gly Arg Tyr Ile Cys Ser Ser His Glu Ala Thr
 245 250 255
 Ile His Asp Leu Ala Arg Met Val Arg Glu Arg His Pro Trp Cys Gly
 260 265 270
 Ser Ile Pro Glu Lys Phe Asp Gly Ile Glu Lys Asp Val Arg Thr Val
 275 280 285
 His Phe Ser Ser Lys Arg Leu Leu Asp Leu Gly Phe Glu Phe Lys Tyr
 290 295 300
 Thr Val Glu Glu Met Phe Asp Glu Ala Ile Arg Ser Cys Val Glu Lys
 305 310 315 320
 Lys Leu Ile Pro Leu Pro Glu Asn Gly Asn Val Asp Ala Ala Ala Gly
 325 330 335
 Ala Lys Asp Met Val His Gly Ala Glu Glu His Ala Arg Ile Ala Met
 340 345 350
 Glu Leu Glu Pro Lys Lys Lys Val Lys
 355 360

<210>11

<211>1297

<212>ADN

<213>Nierembergia hybrida

<220>

<223> Codificación de secuencia de nucleótidos de dihidrofravonol reductasa de Nierembergia hybrida

<400>i1

attcatacta cattttcccg tccttaagta aattttattt ctgaaa atg gca agc	55
Met Ala Ser	
1	
gaa gca gtt cat gct agt ccg aca gtt tgt gtc acc gga gca gct gga	103
Glu Ala Val His Ala Ser Pro Thr Val Cys Val Thr Gly Ala Ala Gly	
5 10 15	
ttc att ggc tct tgg ctt gtc atg aga ctc ctt gaa cgc ggt tat aat	151
Phe Ile Gly Ser Trp Leu Val Met Arg Leu Leu Glu Arg Gly Tyr Asn	
20 25 30 35	
gtt cat gct act gtt cgt gat cct gag aac aag aag aag gtg aaa cat	199
Val His Ala Thr Val Arg Asp Pro Glu Asn Lys Lys Lys Val Lys His	
40 45 50	
cta cag gaa ttg cca aaa gct gat acg aac tta acg ctg tgg aaa gcg	247
Leu Gln Glu Leu Pro Lys Ala Asp Thr Asn Leu Thr Leu Trp Lys Ala	
55 60 65	
gac ttg gcg gta gaa gga agc ttt gat gaa gcc att aaa ggc tgt caa	295
Asp Leu Ala Val Glu Gly Ser Phe Asp Glu Ala Ile Lys Gly Cys Gln	
70 75 80	
gga gta ttt cat gtg gcc act cct atg gat ttc gag tcc aag gac cct	343
Gly Val Phe His Val Ala Thr Pro Met Asp Phe Glu Ser Lys Asp Pro	
85 90 95	
gag aat gaa gta atc aag cca aca gtc cag gga atg ttg agc atc ata	391
Glu Asn Glu Val Ile Lys Pro Thr Val Gln Gly Met Leu Ser Ile Ile	
100 105 110 115	
gaa tca tgt gtt aaa gca aac aca gtg aag agg ttg gtt ttc act tcg	439
Glu Ser Cys Val Lys Ala Asn Thr Val Lys Arg Leu Val Phe Thr Ser	
120 125 130	
tct gct gga act cta gat gtc caa gag caa caa aaa ctc ttc tac gat	487
Ser Ala Gly Thr Leu Asp Val Gln Glu Gln Gln Lys Leu Phe Tyr Asp	
135 140 145	
gag acc agc tgg agc gac ttg gac ttc ata aat gcc aag aag atg aca	535
Glu Thr Ser Trp Ser Asp Leu Asp Phe Ile Asn Ala Lys Lys Met Thr	
150 155 160	
gga tgg atg tac ttt gtt tca aag ata ctc gcg gag aag gct gca atg	583
Gly Trp Met Tyr Phe Val Ser Lys Ile Leu Ala Glu Lys Ala Ala Met	
165 170 175	


```

gtt gaa att tagaactgca atctttcaaa tgtaaaagag gcaagcttgc ctatcaacat 1218
Val Glu Ile
ctttgcttct aagttgtcat ctatttgitt cttaaatgct aaagcagtaa aaggttcaat 1278
gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1297
<210>12
<211>374
<212>PRT
<213>Nierembergia hybrida
<220>
<223>secuencia de aminoácidos de dihidroflavonol reductasa de Nierembergia hybrida
<400>12
Met Ala Ser Glu Ala Val His Ala Ser Pro Thr Val Cys Val Thr Gly
 1           5           10           15
Ala Ala Gly Phe Ile Gly Ser Trp Leu Val Met Arg Leu Leu Glu Arg
           20           25           30
Gly Tyr Asn Val His Ala Thr Val Arg Asp Pro Glu Asn Lys Lys Lys
           35           40           45
Val Lys His Leu Gln Glu Leu Pro Lys Ala Asp Thr Asn Leu Thr Leu
           50           55           60
Trp Lys Ala Asp Leu Ala Val Glu Gly Ser Phe Asp Glu Ala Ile Lys
           65           70           75           80
Gly Cys Gln Gly Val Phe His Val Ala Thr Pro Met Asp Phe Glu Ser
           85           90           95
Lys Asp Pro Glu Asn Glu Val Ile Lys Pro Thr Val Gln Gly Met Leu
           100          105          110
Ser Ile Ile Glu Ser Cys Val Lys Ala Asn Thr Val Lys Arg Leu Val
           115          120          125
Phe Thr Ser Ser Ala Gly Thr Leu Asp Val Gln Glu Gln Gln Lys Leu
           130          135          140
Phe Tyr Asp Glu Thr Ser Trp Ser Asp Leu Asp Phe Ile Asn Ala Lys
           145          150          155          160
Lys Met Thr Gly Trp Met Tyr Phe Val Ser Lys Ile Leu Ala Glu Lys
           165          170          175
Ala Ala Met Glu Glu Ala Lys Lys Asn Asn Ile Asp Phe Ile Ser Ile
           180          185          190
Ile Pro Pro Leu Val Val Gly Pro Phe Ile Thr Pro Ser Phe Pro Pro

```

195	200	205
Ser Leu Ile Thr Ala Leu Ser Leu Ile Thr Gly Asn Glu Ala His Tyr		
210	215	220
Cys Ile Ile Lys Gln Gly Gln Tyr Val His Leu Asp Asp Leu Cys Glu		
225	230	235
Ala Tyr Ile Phe Leu Tyr Glu His Pro Lys Ala Glu Gly Arg Phe Ile		
245	250	255
Cys Ser Ser His His Ala Ile Ile Tyr Asp Val Ala Lys Met Ile Arg		
260	265	270
Glu Lys Trp Pro Glu Tyr Tyr Val Pro Thr Glu Phe Lys Gly Ile Ala		
275	280	285
Lys Asp Leu Pro Val Val Ala Phe Ser Ser Lys Lys Leu Thr Asp Met		
290	295	300
Gly Phe Gln Phe Lys Tyr Thr Leu Glu Asp Met Tyr Lys Gly Ala Ile		
305	310	315
Glu Thr Cys Arg Gln Lys Gln Leu Leu Pro Phe Ser Thr Asn Arg Pro		
325	330	335
Ser Glu Asn Gly Leu Asp Lys Glu Ala Ile Ser Ile Ser Ser Glu Asn		
340	345	350
Phe Ala Ser Gly Lys Glu Asn Ala Pro Val Ala Asn His Lys Val Lys		
355	360	365
Leu Thr Ser Val Glu Ile		
370		

<210>13

<211>20

<212>ADN

<213>secuencia artificial

<220>

<221>

<222>

<223>Cebador DFR-2F

<400>13

caagcaatgg catcggaatc

<210>14

<211>22

<212>ADN

<213>Secuencia artificial
 <220>
 <221>
 <222>
 <223>Cebador DFR-2B
 <400>14
 tttccagtga gtggcgaag tc 22
 <210>15
 <211>20
 <212>ADN
 <213>Secuencia artificial
 <220>
 <221>
 <222>
 <223>Cebador ANS-2F
 <400>15
 tggactcgaa gaactcgtcc 20
 <210>16
 <211>19
 <212>ADN
 <213>Secuencia artificial
 <220>
 <221>
 <222>
 <223>Cebador ANS-2B
 <400>16
 cctcaccttc tcccttgtt 19
 <210>17
 <211>17
 <212>ADN
 <213>Secuencia artificial
 <220>
 <221>
 <222>
 <223>Cebador ATC
 <400>17

gayttyggit ggggiaa	17
<210>18	
<211>23	
<212>ADN	
<213>Secuencia artificial	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>Cebador Origo DT	
<400>18	
tttttttttt tttttttctc gag	23
<210>19	
<211>26	
<212>ADN	
<213>Secuencia artificial	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>Cebador RDF310	
<400>19	
ccctcgagcc cttgatggcc tcgtcg	26
<210>20	
<211>26	
<212>ADN	
<213>Secuencia artificial	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>Cebador RDF830	
<400>20	
gggtcgagcc ggccctctgc tttcgg	26
<210>21	
<211>2934	
<212>ADN	
<213>Rosa	
<220>	

<223>Secuencia de nucleótidos de promóter de chalcona sintasa de rosa
<400>21

aagcttcagc aagagttgaa gaaataggga cagagccatc catgigcitt gatgaatctg	60
atgggataca aaatgtgaaa gattcacttg ctgatttate cagaattict tcatatagtg	120
aggagaaatgt tgaagaatct aatgatgagc actcigttaa actagacgga attcattgtc	180
agcaccgagtg tcatgagggc agtgaagaag acaaacciga tggtaagagc ggigagaatg	240
cagttgatct ggctaatacat ggcatggctc gaactgattt ttgtcagata acagaagaga	300
ttgagaatgg agtaglcalc actgagatga gcaacattgc caaccctgat aaaactgata	360
ttccaaacgg ggtgcctcaa aatgagactg atgatggatt taataacact caggatgatg	420
ctaatacaaa ggaagtgaca gaagagaatt ctgacagacg tgcgaaggaa gtgacagaag	480
agaattctga caaagatggt ttgaagaata tcttgaatt ctacagtgt tcttctgtgg	540
tggattttga aattccagtg ttgatgtga aatttacttc tcttgaagt tgcagtgcc	600
cttgttctct tgcagccctt ttgtctgaat cgcctggaatc aatgactgaa gcacctgtg	660
tgaggcaaat tgatgatgtg cccccggttg gtgaggagtc tagcttgatt ttggtggaag	720
atcgggagcc ggttggctct actcctgatg gtaatttttc tgtggalatg gattactata	780
gtgtagcaga acctttgagc acatgggatg cgaatctgca gltgaaaca tcaaatagcc	840
atgagacttt tgcctcaagt ctcatctgat agcttctgtg ttaataactt tgttagtctg	900
tacataaatt tgtctagaca agaattggtc gtgtactatc gltgtttttt gccgtgcttt	960
agtactcatg aaccaattca gagaaaactg gctgcatatt ttgaggagtc tctgaattct	1020
tcaatgctca actggtatgc atgtaggtgg catalcactt cagggattct tctattcitt	1080
aactttacgc atcttgacat ttigtatata acaaaatcag gtctattggg tgaagtaat	1140
tggctagaat ggaaagctct acggttttac cgcaggicaa tttcatagc tccacaagtg	1200
aattgaaaat gctcataggc tttatgtttg tctccacct ctggcgacga tgtttgtttg	1260
ggagttaact caaacctacc accaaactcg aacctatctt ccataattta taatacaaat	1320
ttgcgatcat ttgttcatcc aattattgtg acactcggct accacccaaa atatcggtea	1380
cagacccaaa cgtattgtca caacaaatcg tgtctctcgc attaaacaca gctagaaaga	1440
agagttgaac ccacaattcg agcaccact acctatgtac gaagtcatga gttcgagtea	1500
ccataggggt agaagtgaaa tcatttgatc atctttaaag aaataaaaagg aagagttgaa	1560
cccacaattg gctcttgtcc caaaaagaac taatagtcca gtgcaccgac gtgtatttgc	1620
accgacataa atggattggt agattatatt aaatacactc ttaggttatt aataaaaata	1680
ttaattataa atatcaaaag ttgagatcat ctataaaatg ttgggtcagt tacaccgtcg	1740
gtgcatagaa taatttccaa actatataat agccttcatt tctgatita gctcatggga	1800
catgattgct ataaataat gtactcgtag aggcatactt gtgtcttttt atacagttgt	1860
actgaagctc agaaaagttt atgaaggtga gaactgagaa gggcaaggca tttggtagtt	1920
gaggtatatg agagcatgaa ccccatgcat tgcagctacc acctctcttt tttccttctt	1980
cccatacaaa taaaaccaac tcttctcacc taagtctatc atcttttatt atggcagctc	2040

ES 2 370 175 T3

ttgcttaatt agctcatcia tattatatta tttatctata atatgtgtca ctctgtctac	2100
ctaccagccc aaaataaac tgataatagt caatttgatg atatTTTTTg tTTTTgttt	2160
tgttttgtct tttttgtatt gattttttta aaattaaaat gacttcattt tttgttttg	2220
tttttttttc tttttttttt tatagaaaaa ttggcaaact ttcattatct gttattgatg	2280
acaattaagc cattaaaacc tataattaat tatctttcaa ttcgagtaaa tttaaaacgg	2340
tgtaaaatta aaatatgatc gtattcttaa atgaataaaa ctcaactaat aatagtaata	2400
cttgaatcac atctacgaac atagattctt ttcattccagt ctaacatgt ttgaatatat	2460
agagtttgat tatggttatg tctttgtcca cattttgggt tgtaataaaa tgtgcaacgg	2520
aggtatggta ctgttgctct atcaaatca agtttgaatt aaaagaaaa aaaaaagacg	2580
atatTTTgtg cgctttgttt ggtaggtaaa acgagagaac aaacgcattc caaatcatgc	2640
ggatTTTgat cggcaacaca caccacaaa aaccgtacac gatgcacgtg ccatttgccg	2700
ggggTTTcta acaaggtaat tgggcaggca cgtgatcccc cagctacca cctctcgctt	2760
cccttctcaa actccttttc catgtatata tacaacctt tttctcagac cattatattc	2820
taacatTTTt gctttgctat tgtaacgcaa caaaaactgc tcattccatc cttgttcttc	2880
cccattttga tcttctctcg acccttctcc gagatgggta ccgagctcga attc	2934

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una rosa caracterizado por la supresión artificial de la ruta de síntesis flavonoide de la rosa y la expresión del gen del pensamiento que codifica la flavonoide 3',5'-hidroxilasa que presenta la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID No 1 ó 3, donde la vía de síntesis flavonoide de la rosa
- 5 se suprime mediante
- (i) la supresión artificial de la expresión de la dihidroflavonol reductasa endógena de la rosa; o
- (ii) la supresión artificial de la expresión de la flavonoide 3'-hidroxilasa endógena de la rosa.
2. Un procedimiento para producir una rosa de conformidad con la reivindicación 1 (i), que comprende además la expresión del gen que codifica la dihidroflavonol reductasa derivada de una planta que no sea la rosa.
- 10 3. Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 2, donde la planta que no es la rosa es el lirio, la Nierembergia o la petunia.
4. Una rosa obtenida mediante el procedimiento de producción de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o su progenie o tejido que tiene las mismas propiedades que la rosa.
- 15 5. Una rosa obtenida mediante el procedimiento de producción de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o su progenie o tejido que tiene las mismas propiedades que la rosa, donde el color de los pétalos de la rosa es violeta.
6. Una rosa de conformidad con la reivindicación 5 o su progenie o tejido que tiene las mismas propiedades que la rosa, donde el color de los pétalos de la rosa pertenece al "grupo violeta" de conformidad con la tabla de colores de la Real Sociedad de Horticultura (RHSCC).
- 20 7. Una rosa de conformidad con la reivindicación 6 o su progenie o tejido que tiene las mismas propiedades que la rosa, donde el color de los pétalos de la rosa pertenece al "grupo violeta" 8Sa u 85b de conformidad con la tabla de colores de la Real Sociedad de Horticultura (RHSCC).

Fig.1

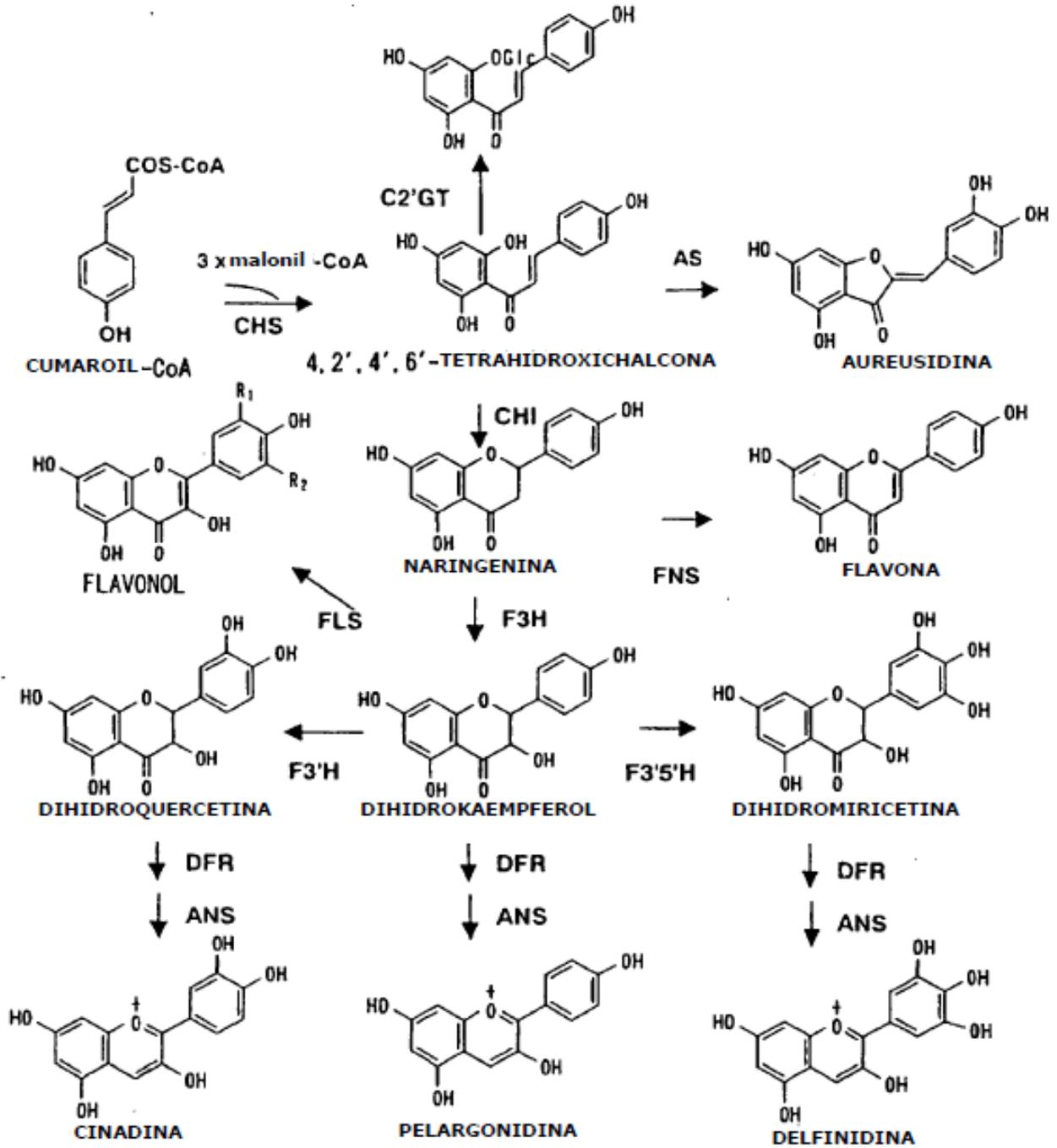


Fig.2

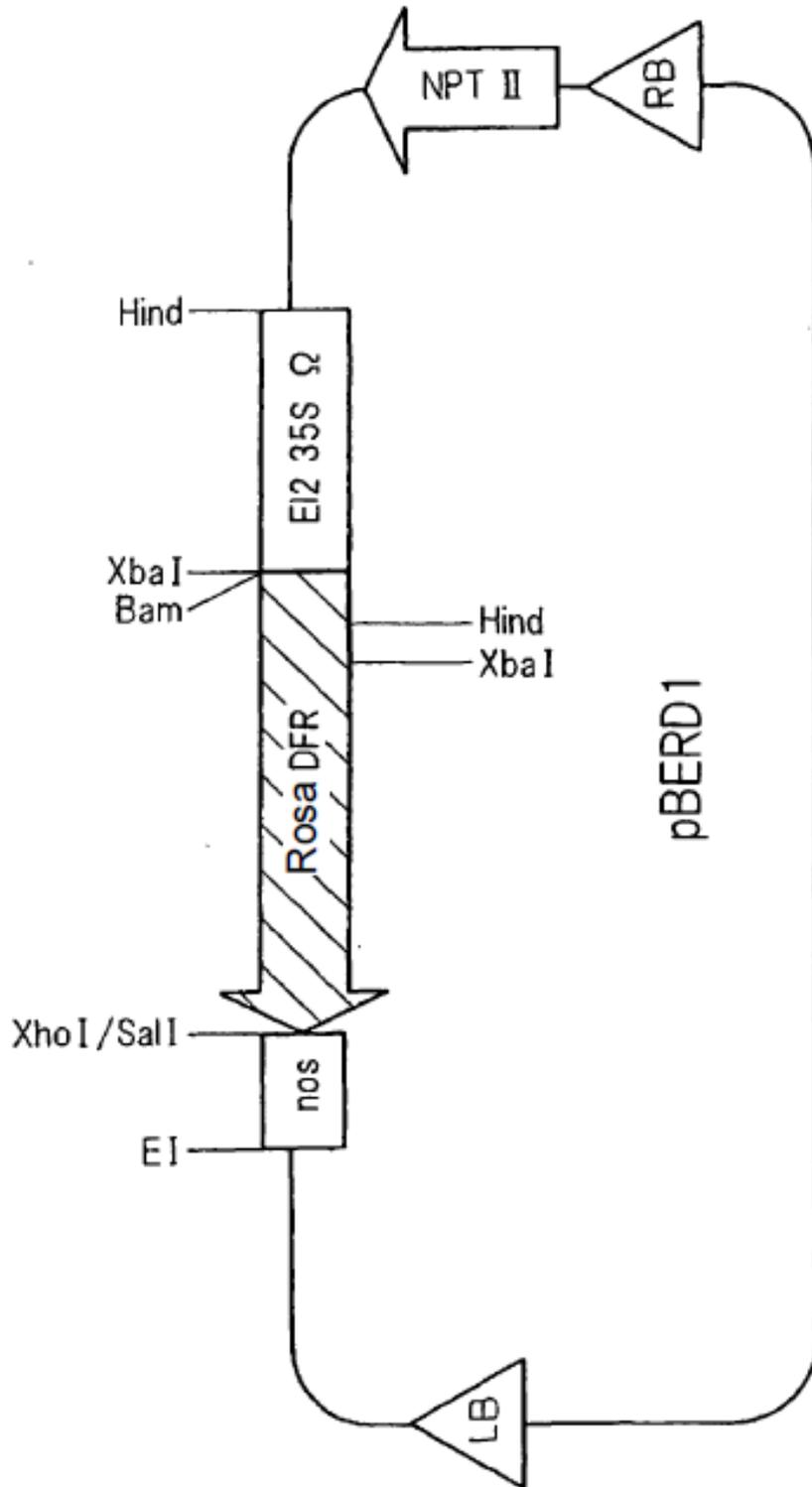


Fig.3

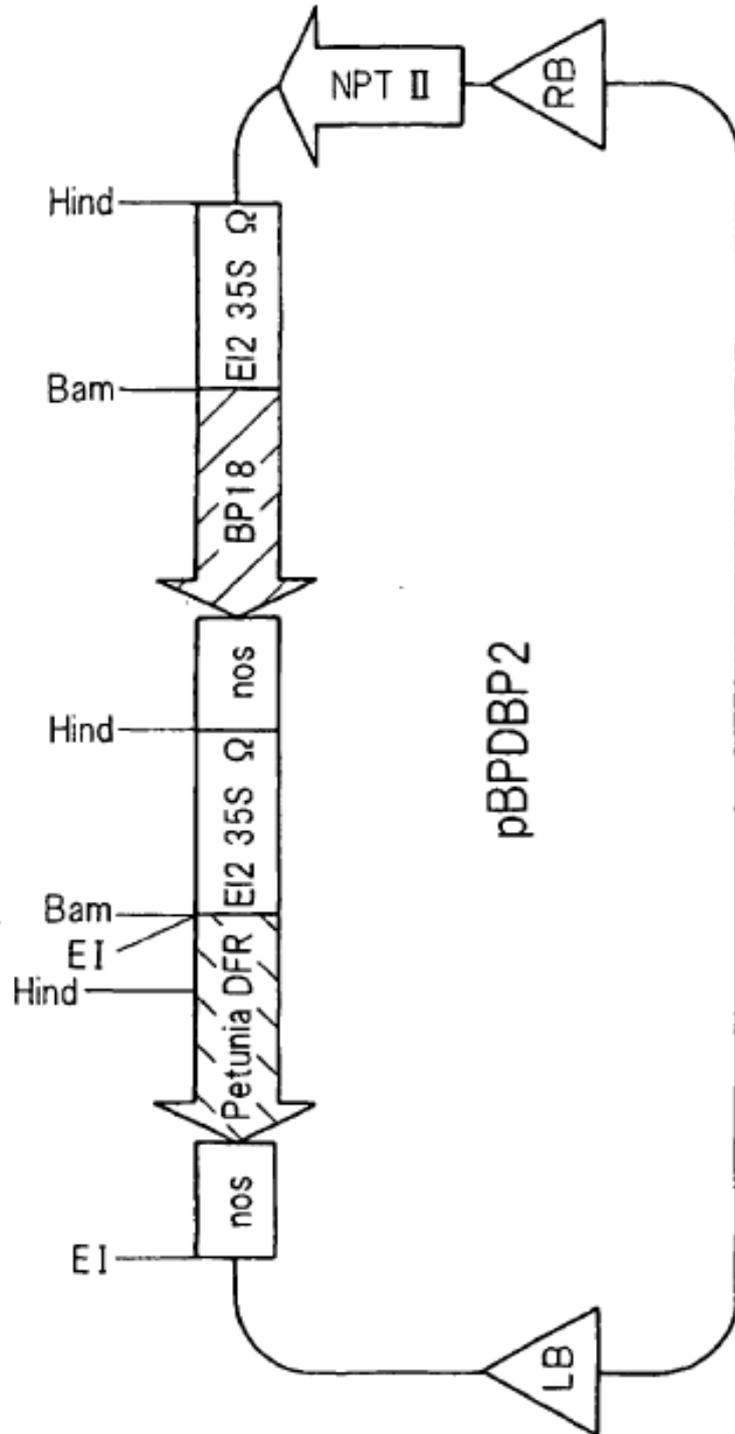


Fig.4

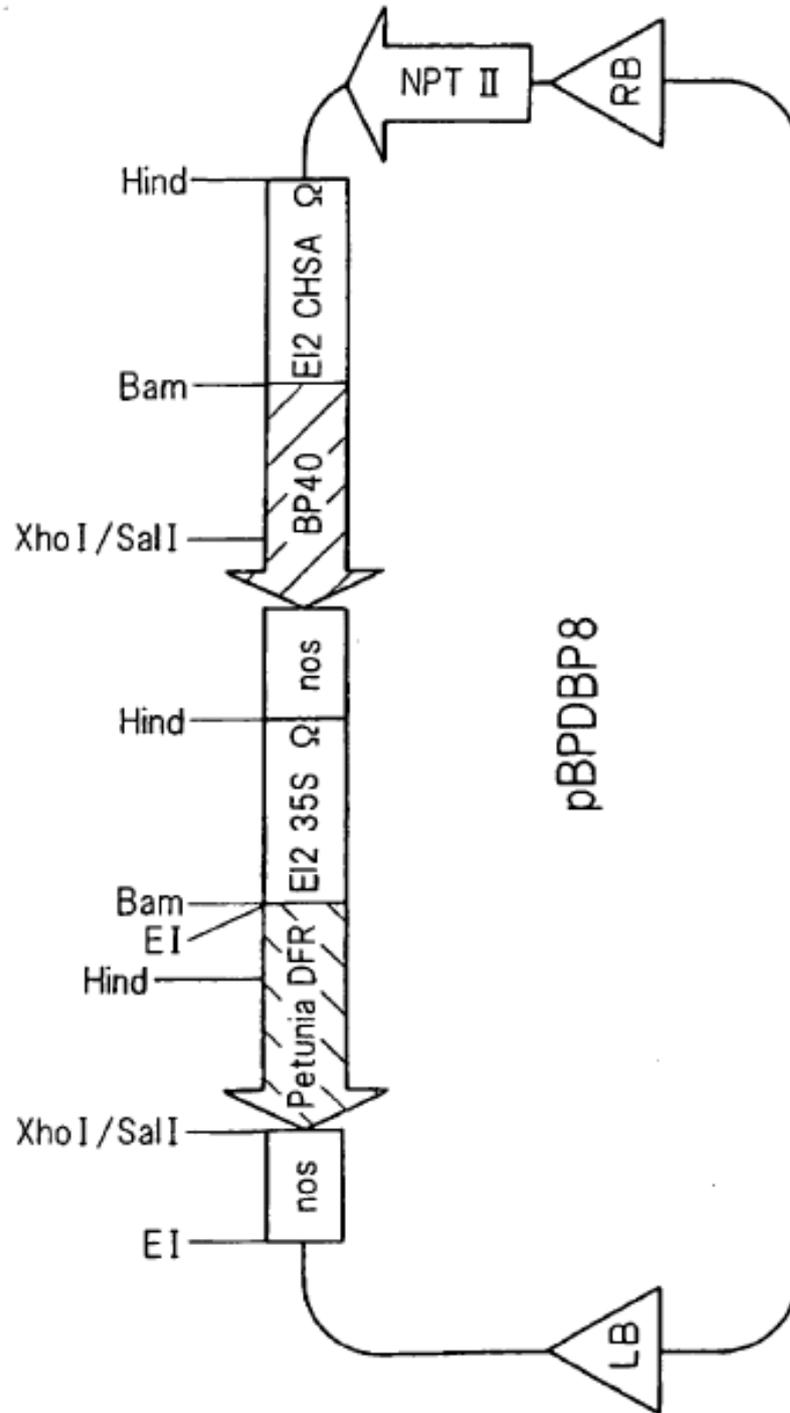


Fig.5

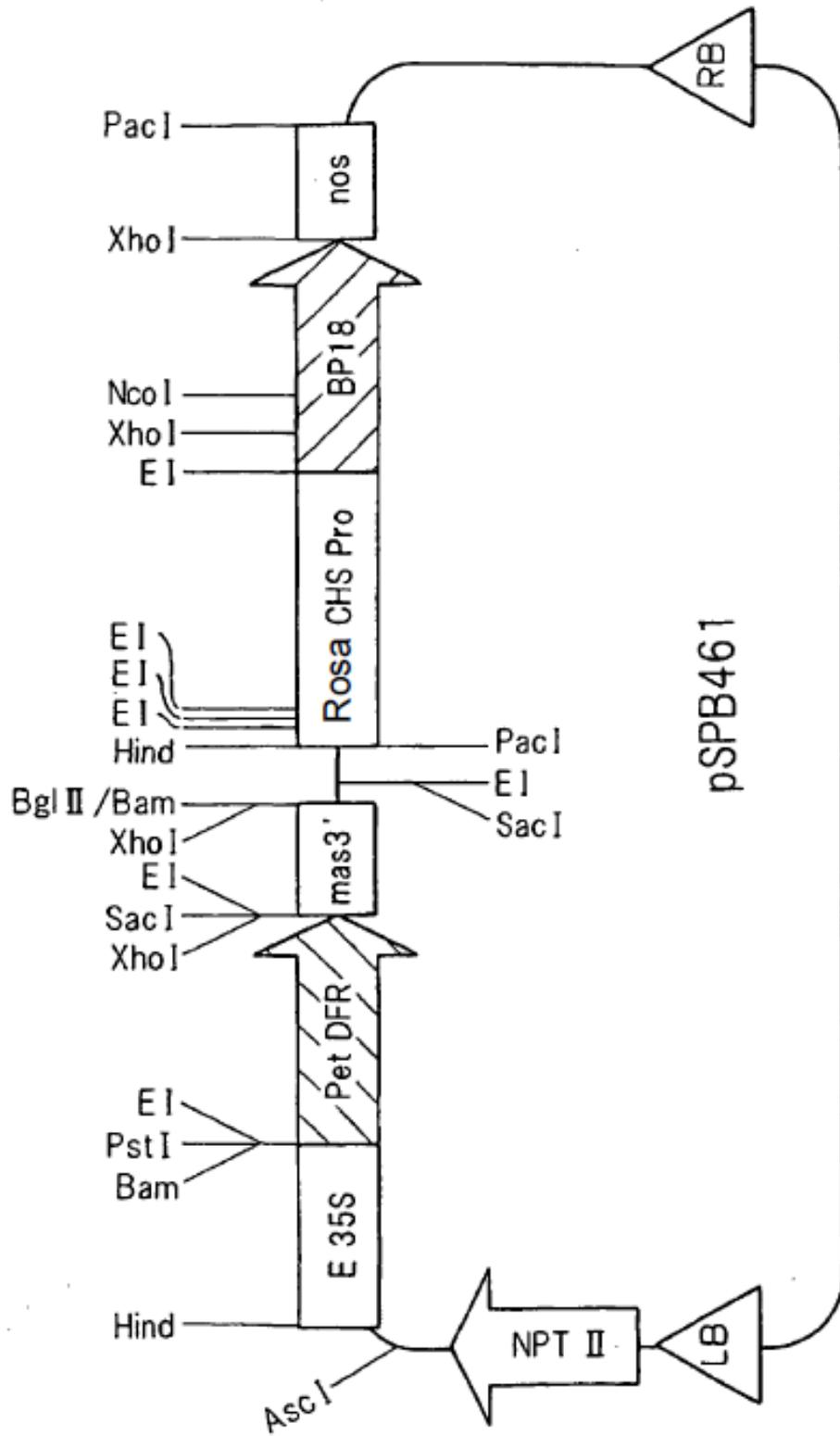
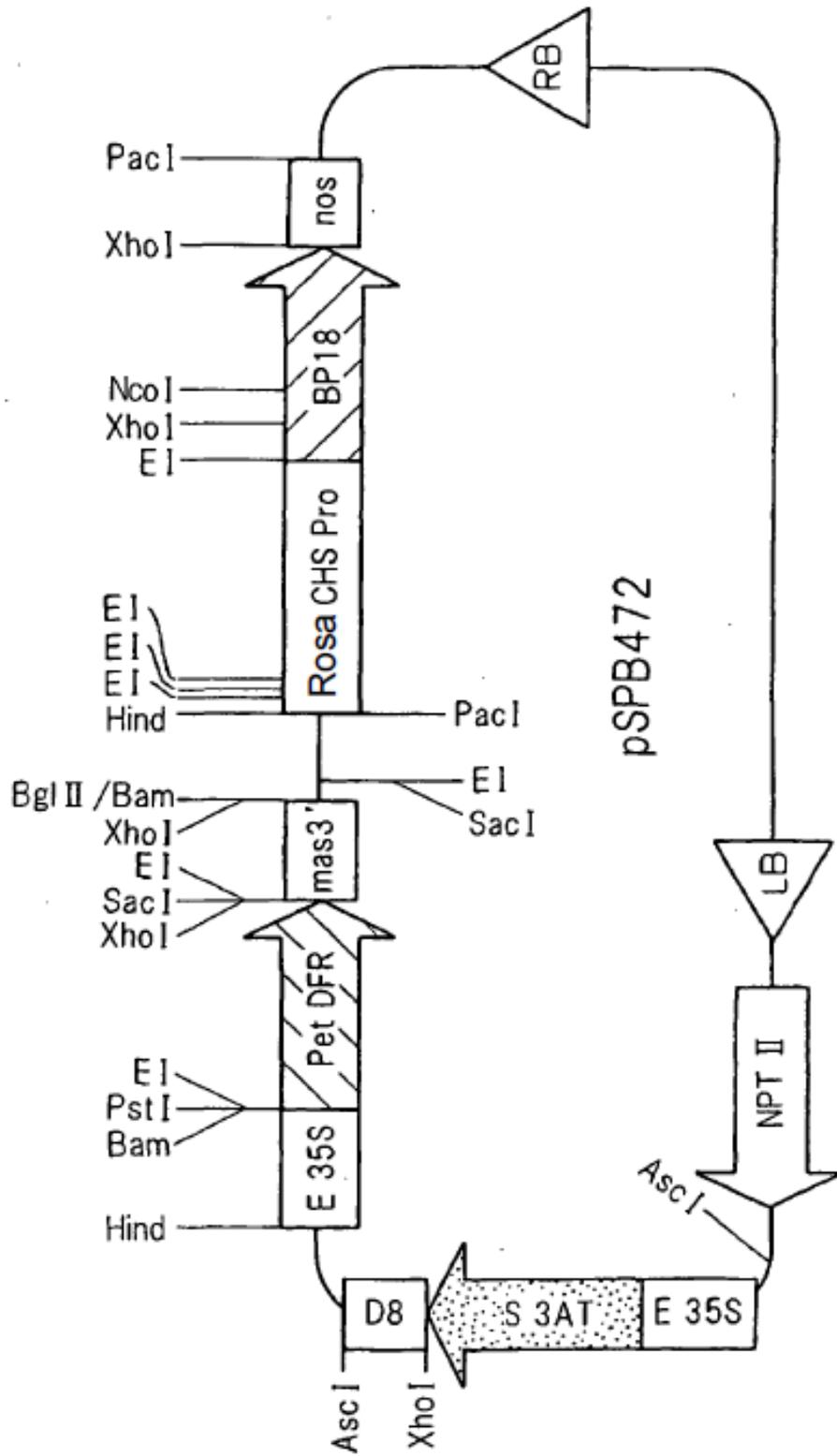


Fig.6



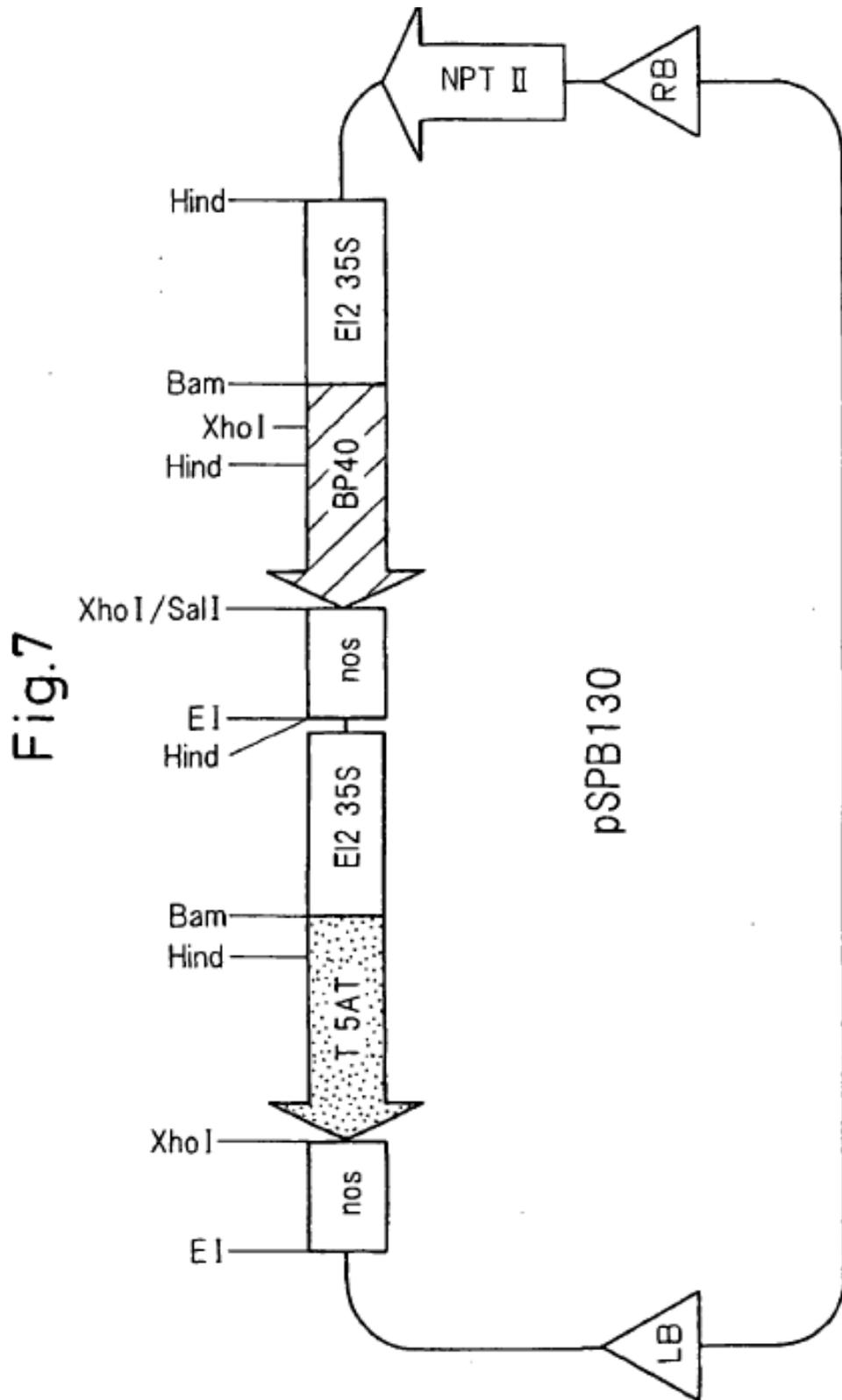


Fig.8

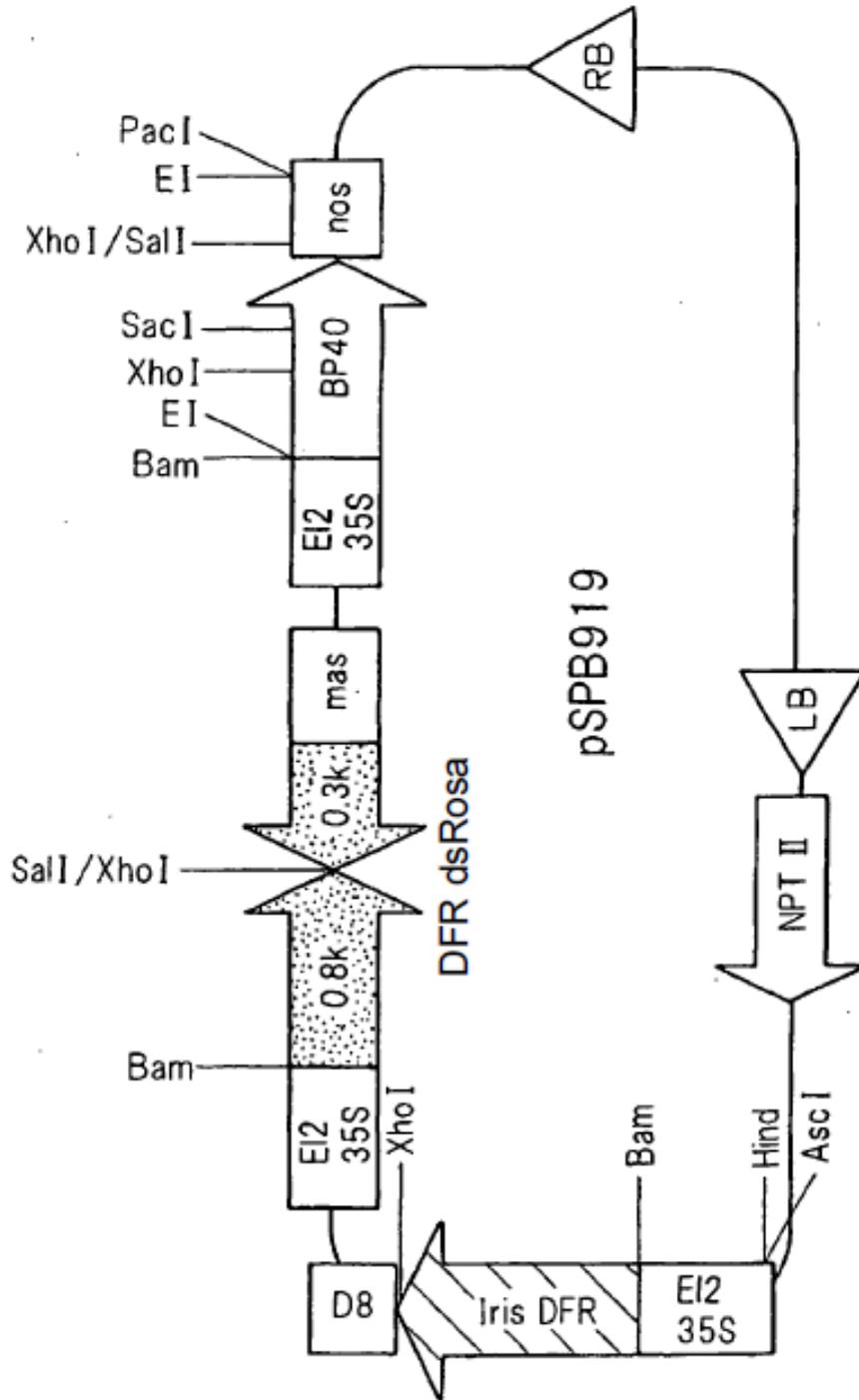


Fig.9

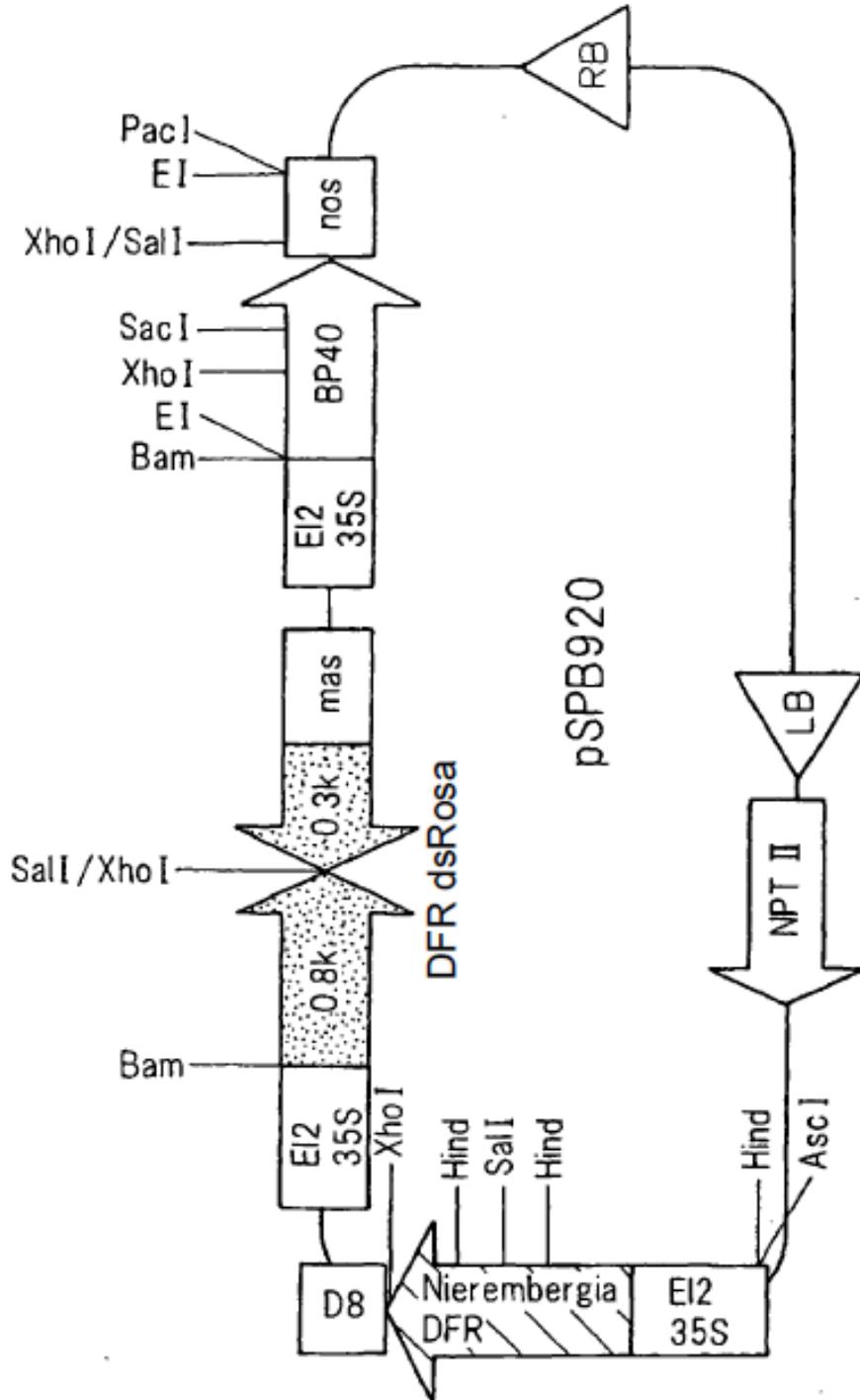


Fig.10

