

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 704**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 08752160 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 2143322**

54 Título: **Método para la producción de una orquídea polilla que tiene un color de flor modificado**

30 Prioridad:

26.04.2007 JP 2007116396

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

12.07.2013

73 Titular/es:

**ISHIHARA SANGYO KAISHA, LTD. (100.0%)
3-15, EDOBORI 1-CHOME, NISHI-KU
OSAKA-SHI OSAKA 550-0002, JP**

72 Inventor/es:

**ARAKI, SATOSHI;
SUZUKI, TAKANORI y
KATAYAMA, KOUICHI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 412 704 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

Método para la producción de una orquídea polilla que tiene un color de flor modificado

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para modificar el color de la flor de una orquídea polilla mediante el empleo de la tecnología de recombinación de genes. En particular, se refiere a un método para producir una orquídea polilla que tiene un color de flor rojo mediante la introducción de genes que codifican enzimas relacionadas con la biosíntesis de cianidina en una orquídea polilla.

Técnica anterior

El color de la flor es un carácter particularmente importante en las plantas ornamentales, y se han producido hasta ahora flores que tienen diferentes colores mediante cruzamiento. Sin embargo, cuando sólo un carácter específico, tal como color de la flor se introduce en una variedad específica mediante cruzamiento, debido a la incertidumbre del cruzamiento, es necesario repetir el retrocruzamiento a lo largo de varias generaciones, y se requiere una gran cantidad de esfuerzo y tiempo. Además, el período de cruzamiento varía en función de las especies de plantas, y en los casos de las orquídeas tales como las orquídeas polilla, que tienen un largo período de floración, es prácticamente imposible producir una variedad con un carácter deseado sólo mediante cruzamiento. Por lo tanto, a pesar de la demanda del mercado, ha sido muy difícil cambiar el color de la flor de la orquídea polilla a un color deseado.

En los últimos años, es posible hibridar diferentes especies o géneros mediante tecnología de ADN recombinante, y se espera producir una nueva variedad que tenga un color que no se pueda obtener mediante el cruzamiento convencional.

El color de la flor deriva principalmente de tres tipos de pigmentos: antocianinas, carotenoides y betalaínas. Entre ellos, la antocianina es el pigmento que tiene el intervalo más amplio de longitud de onda de absorción máxima y abarca los colores de rojo a azul. La antocianina es un tipo de flavonoide y se sintetiza biológicamente a través de una ruta metabólica mostrada en la Fig. 1. El color de antocianina depende sustancialmente de su estructura química, especialmente del número de grupos hidroxilo en el anillo B. La hidroxilación del anillo B es catalizada por un flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) y un flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H). Cuando no hay actividad F3'H ni actividad F3'5'H en las células de los pétalos, se sintetiza pelargonidina (naranja), y cuando hay actividad F3'H, se sintetiza cianidina (rojo). Además, cuando hay actividad F3'5'H, se sintetiza delfinidina (azul). Por lo tanto, con el fin de producir el color de la flor rojo, se considera que es importante el papel de F3'H.

En un caso de alteración genética del color de la flor, se produjo una rosa azul usando un gen F3'5'H de *Viola X wittrockiana* (Documento de Patente 1).

Por otra parte, se informó de la alteración del color de la flor de una orquídea polilla de rosa a magenta mediante la expresión en exceso un gen endógeno (documento no de patente 1).
Documento de Patente 1: WO2005/017147
Documento no de Patente 1: Su y Hsu, *Biotechnology Letters* (2003) 25: 1933-1939.

Descripción de la invención**Objeto que se logra mediante la invención**

Un objeto de la presente invención es identificar los genes necesarios para cambiar el color de la flor de una orquídea polilla, y proporcionar un método para la producción de una orquídea polilla que tiene un color de la flor rojo cambiando el color de la flor de una orquídea polilla a rojo mediante la introducción de los genes en la orquídea polilla y expresándolos.

Medios para lograr el objetivo

Los autores de la presente invención han llevado a cabo un extenso estudio sobre la introducción de genes que codifican enzimas relacionadas con la biosíntesis de cianidina, y como resultado, encontraron que la introducción de los genes que codifican las cuatro enzimas aguas abajo de la naringenina en células de pétalo de una orquídea polilla blanca permite que las células de los pétalos sintetizen el pigmento rojo cianidina. De este modo, se ha completado la presente invención.

La presente invención se basa en el descubrimiento y proporciona:

1. (1) Un método para producir una orquídea polilla que tiene un color de la flor modificado, que comprende la

transfección de una orquídea polilla con un gen que codifica una flavanona 3-hidroxilasa, un gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa, un gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa de *Gerbera* o *Torenia* y un gen que codifica una antocianidina sintasa y la expresión de los genes.

- 5 2. (2) El método de acuerdo con (1), en donde el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa deriva de una orquídea polilla o *Gerbera*.
3. (3) El método de acuerdo con (1), en donde el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 1 o 3.
4. (4) El método de acuerdo con (1), en donde el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 5 o 7.
- 10 5. (5) El método de acuerdo con (1), en donde el gen que codifica una flavanona 3-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por la SEC ID NO: 9.
6. (6) El método de acuerdo con (1), en donde el gen que codifica una antocianina sintasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 11 o 13.
- 15 7. (7) El método de acuerdo con (1), en donde el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 1 o 3, y el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa tiene una secuencia de ADN representada por los SEQ ID NO: 5 o 7.
8. (8) El método de acuerdo con (1), en donde el gen que codifica una flavanona 3-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 9, y el gen que codifica una antocianina sintasa tiene una secuencia de ADN representada por la SEQ ID NO: 11 o 13.
- 20 9. (9) El método de acuerdo con (1), en donde el gen que codifica una flavanona 3-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 9, el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 1 o 3, el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 5 o 7, y el gen que codifica una antocianina sintasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 11 o 13.
- 25 10. (10) El método de acuerdo con (1), en donde el gen que codifica una flavanona 3-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 9, el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 1, el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 5, y el gen que codifica una antocianina sintasa tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 11 o 13.
- 30 11. (11) Una orquídea polilla que tiene un color de la flor modificado, como se define adicionalmente por medio de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15.

En la presente invención, la "flavanona 3-hidroxilasa" (en lo sucesivo denominada también F3H) es una enzima que cataliza una reacción que produce dihidrocanferol a partir de naringenina. La "flavonoide 3'-hidroxilasa" (en lo sucesivo denominada también F3'H) es una enzima que cataliza una reacción, que produce dihidroquercetina a partir de dihidrocanferol. La "dihidroflavonol 4-reductasa" (en lo sucesivo denominada también DFR) es una enzima que cataliza una reacción que produce leucocianidina a partir de dihidroquercetina, y la "antocianidina sintasa" (en lo sucesivo denominada también ANS) es una enzima que cataliza una reacción que produce cianidina a partir de leucocianidina.

40 Efecto de la presente invención

De acuerdo con la presente invención, es posible producir una nueva variedad de orquídea polilla que tiene un color de la flor rosa o rojo a partir de una orquídea polilla de color blanco cambiando el color de la flor, mientras se mantienen las superioridades de otros caracteres distintos del color de la flor.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ruta de síntesis de antocianina

La Figura 2 es un vector plasmídico utilizado para la transfección de una pétalo con un gen. P-35S de CaMV es un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Ω es una secuencia omega del virus del mosaico del tabaco. T es una secuencia de terminación de la transcripción derivada de un virus del mosaico de la coliflor.

La Figura 3 muestra la identificación de los genes necesarios para cambiar el color de los pétalos de una orquídea polilla de blanco a rojo.

La Figura 4 muestra la transfección de un pétalo de *Phal. amabilis* con los genes F3'H derivados de diferentes plantas.

La Figura 5 muestra la transfección de un pétalo de *Phal. amabilis* con genes DFR derivados de diferentes plantas.

La Figura 6 muestra la transfección de un pétalo de *Phal. amabilis* con genes ANS derivados de diferentes plantas.

La Figura 7 es una vista esquemática que muestra un procedimiento para la construcción de ADN para la transformación de la orquídea polilla.

La Figura 8 es una vista esquemática que muestra un procedimiento para la construcción de ADN para la transformación de la orquídea polilla.

Mejores modos de llevar a cabo la invención

5 Ahora, se describirá en detalle la presente invención, y a partir de estas descripciones, se pondrán de manifiesto para los expertos en la técnica otros objetos, características, superioridades y aspectos de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que las descripciones de la presente memoria descriptiva, incluyendo las siguientes explicaciones, ejemplos específicos, etc. muestran realizaciones preferidas y se realizan sólo a efectos de explicación. Los expertos en la técnica pueden realizar diversos cambios y/o modificaciones (o alteraciones) basándose en la presente memoria descriptiva. Además, todos los Documentos de Patente y las referencias citadas
10 en la presente memoria descriptiva se citan con el fin de explicarla.

En la presente invención, se pueden utilizar como genes que codifican F3H, F3'H, DFR y ANS, genes novedosos o convencionales. Entre los genes convencionales, el gen que codifica F3H puede ser un gen registrado en GenBank (número de acceso: DQ394303, AY221246, AJ493133, AY641730, AF184270, AB078956, AB201760, AY669324, AF036093, AB211958, AB187027 o AB234905), el gen que codifica F3'H puede ser un gen registrado en GenBank (número de acceso: AAG49298, ABA64468, BAE47004, BAE47005, BAE47006, BAE71221, BAE72874, CAI54278, NP_920627 o Z17221), el gen que codifica DFR puede ser un gen registrado en GenBank (número de acceso: AB012924 o Z17221), y el gen que codifica ANS puede ser un gen registrado en GenBank (número de acceso: AY585677, AY228485, AF015885, AY581048, U82432, AY695817, AB208689, AY997840, AY997842, AY382828, AY256380, AF026058, Y07955, AF384050, AB097216, AB087206, AB198869, AB044091, AY123768 o AB234906). Aunque la presente memoria descriptiva describe el aislamiento de un gen que codifica F3'H (SEQ ID NO: 3), un gen que codifica DFR (SEQ ID NO: 7) y un gen que codifica ANS (SEC ID NO: 13) de *Gerbera* mediante el uso de cebadores diseñados a partir de las secuencias identificadas por los números de acceso Z17221 y AY997842 y el aislamiento de un gen que codifica F3'H (SEQ ID NO: 87) y un gen que codifica DFR (SEQ ID NO: 5) de *Torenia* mediante el uso de cebadores diseñados a partir de las secuencias identificadas por los números de acceso AB057672 y AB012924 en los Ejemplos 4 y 5, respectivamente, resulta obvio que también se pueden utilizar otros genes convencionales que se pueden aislar de manera similar. Además, también se pueden utilizar genes novedosos que se encuentran en la presente invención tales como el gen que codifica F3H (SEQ ID NO: 9), el gen que codifica F3'H (SEQ ID NO: 1), el gen que codifica la DFR (SEQ ID NO: 15) y el gen que codifica la ANS (SEQ ID NO: 11) de una orquídea polilla.
15
20
25
30

En *Gerbera*, el gen que codifica F3'H tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 3, el gen que codifica DFR tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 7, y el gen que codifica ANS tiene una secuencia de ADN representada por el SEC ID NO: 13. En *Torenia*, el gen que codifica DFR tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 5. En la orquídea polilla, el gen que codifica F3H tiene una secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 9, el gen que codifica F3'H tiene una secuencia de ADN representada por el SEC ID NO: 1, y el gen que codifica ANS tiene una secuencia de ADN representada por los SEC ID NO: 11.
35

En la presente invención, como gen que codifica F3'H, se prefiere utilizar el gen derivado de una orquídea polilla o *Gerbera*, especialmente el gen derivado de una orquídea polilla. En la presente invención, como gen que codifica DFR, se utiliza el gen de *Gerbera* o *Torenia*, preferiblemente el gen de *Torenia*. En la presente invención, se prefiere que el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) sea el gen derivado de una orquídea polilla o *Gerbera*, y el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) sea el gen de *Gerbera* o *Torenia*, porque el color de la flor sería de color rojo oscuro.
40
45

En la presente memoria descriptiva, el término, gen, se utiliza en el sentido más amplio y significa una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la enzima o una secuencia de ADN complementaria a la misma. La molécula de ácido nucleico puede contener, además del exón que codifica la secuencia de aminoácidos, un intrón, una región no traducida 5' y una región no traducida 3'.
50

En la presente invención, un gen derivado de una planta específica significa un gen registrado en GenBank como derivado de la planta. El gen puede ser un gen mutado de forma espontánea o artificial que tiene una alta similitud con el gen registrado. La alta similitud significa que la homología entre las secuencias de aminoácidos codificadas por ellos es al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 98%.
55

En la presente invención, los genes se introducen en una orquídea polilla a través de un vector recombinante, especialmente un vector de expresión. El vector de expresión tiene una región de regulación de la expresión tal como un promotor, un terminador, un origen de replicación de ADN, etc. adecuado para la especie anfitriona en la que se introducen los genes. El promotor puede ser un promotor que induce la expresión del gen en células de pétalo, tal como el promotor del gen CHS en la orquídea polilla o el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). El terminador puede ser, por ejemplo, el terminador del gen CHS en la orquídea polilla o el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).
60

Específicamente hablando, se prefiere ligar cada gen aguas abajo del extremo 3' de la secuencia promotora, y añadir una secuencia de terminación de la transcripción aguas abajo del gen. El vector de expresión se puede producir de acuerdo con un método convencional mediante el uso de una endonucleasa de restricción, una ligasa, etc. Además, la transformación de anfitriones con el vector de expresión también puede llevarse a cabo de acuerdo con un método convencional. En la presente invención, para la expresión de los genes en células de pétalo, se pueden utilizar, por ejemplo, bombardeo con microproyectiles, transformación mediada por *Agrobacterium*, electroporación, transformación mediada por PEG o transformación mediada por virus. La Fig. 7 y la Fig. 8 muestran ejemplos de los vectores utilizados para la transformación mediada por *Agrobacterium* de una orquídea polilla.

El término, expresión génica, se utiliza en el sentido más amplio y puede implicar la producción de ARN solamente o tanto la producción de ARN como la producción de proteínas. La expresión génica en una planta puede ser constitutiva, evolutiva o inducible, y puede ser sistémica o específica de tejido.

En la presente invención, las plantas que se van a transformar son orquídeas, preferiblemente orquídeas polilla. Las orquídeas de polilla incluyen las del género *Phalaenopsis* y las del género *Doritaenopsis*.

La presente invención se refiere a un método para la producción de una orquídea polilla que tiene un color de flor rojo cambiando el color de la flor de una orquídea polilla mediante la introducción de un gen que codifica la F3H, un gen que codifica F3'H, un gen que codifica DFR de *Gerbera* o *Torenia* y un gen que codifican ANS en la orquídea polilla y la expresión los genes. En realizaciones más preferida de la presente invención;

1. (1) el gen que codifica F3'H deriva de una orquídea polilla o *Gerbera*;
2. (2) el gen que codifica F3'H tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 1 o 3;
3. (3) el gen que codifica DFR tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 5 o 7;
4. (4) el gen que codifica F3'H deriva de una orquídea polilla o *Gerbera*, y el gen que codifica DFR es de *Gerbera* o *Torenia*;
5. (5) el gen que codifica F3'H tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 1 o 3, y el gen que codifica DFR tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 5 o 7, o
6. (6) el gen que codifica F3H tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 9, el gen que codifica F3'H tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 1 o 3, el gen que codifica DFR tiene una secuencia de ADN representada por el SEC ID NO: 5 o 7, y el gen que codifica ANS tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 11 o 13.

Ejemplos

Ahora, la presente invención se describirá con mayor detalle haciendo referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos se proporcionan simplemente para describir la presente invención y como referencias de las realizaciones. Estos ejemplos pretenden describir las realizaciones específicas de la presente invención. Adicionalmente, se debe entender que pueden ser posibles los diversos modos basados en el concepto técnico de la presente memoria descriptiva.

Adicionalmente, los métodos generales necesarios para la recombinación de genes, tales como la escisión y la ligación del ADN, la transformación de *E. coli*, la secuenciación de genes y la PCR se llevaron a cabo básicamente de acuerdo con los manuales de los reactivos o aparatos disponibles comercialmente utilizados para cada operación o manual experimental (tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Tercera edición, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press)"). Para la PCR, se utilizó el sistema GeneAmp PCR 9700 (PE Applied Biosystems). A menos que se especifique lo contrario, el aparato se hizo funcionar de acuerdo con un método de funcionamiento convencional descrito en el manual adjunto al aparato. A menos que se especifique lo contrario, todos los ejemplos se llevaron a cabo o se pueden llevar a cabo mediante el uso de mecanismos convencionales, y tales mecanismo son bien conocidos y comunes para los expertos en la técnica.

En cuanto al programa de búsqueda de homología para examinar una secuencia de aminoácidos codificada por el gen novedoso de la presente invención y secuencias de aminoácidos conocidas, se utilizó BLASTP 2.2.15 (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>, Documento: Altschul y col., Nucleic Acids Res. (1997) 25: 3389-3402). Aquí, la homología es del grado de similitud de los aminoácidos a lo largo de la secuencia completa, y su valor se obtiene mediante alineando una secuencia de aminoácidos codificada por el gen novedoso y secuencias de aminoácidos conocidas por orden de similitud elevada, y dividiendo el número de aminoácidos homólogos entre ellos por el número de aminoácidos de la región de comparación. Aquí, una alta similitud es una salida de resultados de alineamiento en un estado (con espacio, valor esperado 10, con filtro) que fue el parámetro de programa BLASTP anterior por defecto. La homología descrita en los presentes ejemplos es la descrita con respecto a una secuencia de aminoácidos conocida, que mostró la homología más alta en el análisis de homología anterior.

Ejemplo 1: Transfección de un pétalo de orquídea polilla con un gen

A menos que se especifique lo contrario en los ejemplos de la presente memoria descriptiva, los pétalos de orquídea polilla fueron transfectados con los diversos genes mediante el siguiente método de transfección génica, y se evaluaron sus propiedades. Todos los genes tenían una estructura de ADN que tenía un promotor en el lado 5' y un terminador en el lado 3' y se introdujeron en las células de pétalo en una forma expresable en las células.

Una yema de orquídea polilla se esterilizó con 1% en peso de disolución acuosa de hipoclorito de sodio durante cinco minutos y se lavó con agua esterilizada 3 veces. A continuación, la yema se resolvió en un sépalo lateral, un sépalo dorsal y pétalo, y el sépalo lateral, el dorsal sépalo y el pétalo se dejaron en un medio de agar que contenía sal NDM (Tokuhara y Mii, Plant Cell Reports (1993) 13: 7-11.) y agarosa al 0,6% en peso. En la presente memoria, se utilizó una yema que tenía una longitud de aproximadamente 15 mm de una orquídea polilla blanca *Phal. amabilis*.

El ADN que se iba a introducir se purificó usando el Hi Speed Plasmid Midi Kit (QIAGEN), y los genes se introdujeron mediante bombardeo con microproyectiles. Adicionalmente, cuando se introdujeron simultáneamente varios genes, se utilizó una mezcla igual de disoluciones de ADN de estos genes como disolución de ADN para la transfección. El ADN se adsorbió sobre partículas de oro en la siguiente proporción. Se mezcló una disolución de ADN en 20 µl de tampón TE (que contenía ADN del plásmido de 2 µg que portaba un gen) con 50 µl de una suspensión de partículas de oro (tamaño de partícula: 1,0 µm, 60 mg/ml en glicerol al 50%), y se añadieron 50 µl de cloruro de calcio 2,5 M y 10 µl de espermidina 0,2 M a 70 µl de la mezcla y se suspendieron, para permitir la adsorción del ADN sobre las partículas de oro. Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, y las partículas se lavaron con etanol del 70% y etanol del 100%, respectivamente. A continuación, el precipitado se suspendió en 60 µl de etanol del 100%. La suspensión se utilizó como una disolución de muestra, y se utilizaron 10 µl de la disolución de muestra para la transfección de un gen. Como pistola génica, se utilizó IDERA GIE-III (TANAKA Co., Ltd.). La transfección de genes se llevó a cabo con una distancia desde la boquilla a la muestra de 12 cm, bajo una presión reducida de -80 kPa, una presión de gas de helio de 0,3 MPa con un tiempo de pulverización de 0,025 segundos. Después de la transfección génica, los pétalos se dejaron en un medio de agar con sal NDM y se cultivaron en un ciclo de luz-oscuridad (intensidad de la luz: 23 µmol/m²/S, período de luz: 16 horas, período de oscuridad: 8 horas) a 25°C.

Ejemplo 2: Preparación de un vector de expresión (pBS-P35T35) para la transfección del gen

pBS-P35T35 es un plásmido que tiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Hohn et al., Current Topics in Microbiology and Immunology (1982) 96: 194-236), una secuencia omega del virus del mosaico del tabaco (Gallie et al., Nucleic Acid Research (1987) 15: 3257-3273), un sitio para la endonucleasa de restricción SmaI y el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor en este orden en pBluescriptII SK(-) (Stratagene) (Fig. 2). Un plásmido que tiene sustancialmente la misma función que pBS-P35T35 se puede construir de la siguiente manera.

Un oligonucleótido SAS-S (5'-CTAGCTAGCGGCGCGCCTGCAGGATATCATTAAATCCCGGG-3'; SEC ID NO: 17) y un oligonucleótido SAS-AS (5'-CCC GGGATTAAATGATATCCTGCAGGCGCGCCGCTAGCTAG-3'; SEC ID NO: 18) se desnaturalizaron térmicamente, a continuación se enfriaron gradualmente a la temperatura ambiente y se trataron con NheI, y el fragmento resultante se ligó entre los sitios XbaI-EcoRV de pBluescriptII SK(-) (Stratagene) para preparar un ADN plasmídico con un sitio de restricción modificado, pBS-SAS. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de ADN de genoma del virus del mosaico de la coliflor (acceso GenBank V00140) como molde, un cebador T-CaMV35S-SseI-F (5'-AACCTGCAGGAAATCACCAGTCTCTCTA-3'; SEC ID NO: 19) y un cebador T-CaMV35S-Ascl-R (5'-GGCGCGCCATCGATAAGGGTTATTAG-3'; SEC ID NO: 20), y la región amplificada se trató con endonucleasas de restricción Sse8387I y Ascl. El fragmento resultante se ligó entre los sitios Sse8387I-Ascl de pBS-SAS para preparar pBS-T35S. El promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y la secuencia omega del virus del mosaico del tabaco se cortaron de pJD301 (Leon et al., Plant Physiology (1991) 95: 968-972) con HindIII y HincII y se ligaron entre los sitios HindIII-SmaI de pBS-T35S para preparar un vector de expresión (pBS-P35T35).

El aislamiento de los genes utilizados en los Ejemplos y la construcción de los ADN introducidos en células vegetales se describen a continuación.

Ejemplo 3: Aislamiento de los genes CHS, CHI, F3H, F3'H, DFR y ANS de orquídea polilla y preparación de ADN para la expresión transitoria.

(1) Aislamiento del gen CHS de la orquídea polilla (PhCHS3)

El ARN total se aisló de pétalos de orquídea polilla (*Dtps. Sogo VivienxDtps. Sogo Yenlin*) inmediatamente antes de la floración mediante el uso de RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) y se utilizó como molde para preparar ADNc mediante SuperscriptII First-Strand Synthesis System (Invitrogen). A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR mediante el uso de este ADNc como molde. En la PCR, se utilizaron como cebadores PhCHS3 F1 (5'-AAGCTTGTGAGAGACGACGGA-3'; SEC ID NO: 21) y PhCHS3 R1 (5'-TGGCCCTAATCCTTCAAATT-3'; SEC ID NO: 22) diseñados a partir de una secuencia del gen CHS orquídea polilla conocido (PhCHS) (Núm. de acceso GenBank: DQ089652). La reacción se llevó a cabo mediante la repetición de una etapa de 94°C durante 30

segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, 25 ciclos. La amplificación se llevó a cabo de nuevo en la misma disolución de reacción en las mismas condiciones de nuevo utilizando el producto de la reacción como molde. El producto de reacción resultante se clonó en el sitio Swal de pBS-P35T35 para obtener p35PhCHS3. A continuación, se determinó la secuencia de ADN completa de gen CHS de la orquídea polilla en p35PhCHS3 (PhCHS3; SEQ ID NO: 23). p35PhCHS3 es el ADN para la expresión del gen CHS de la orquídea polilla en células vegetales.

(2) Aislamiento del gen CHI de la orquídea polilla (PhCHI1)

El ARN total se aisló a partir de pétalos de orquídea polilla (*Dtps. Sogo Vivien* × *Dtps. Sogo Yenlin*) inmediatamente antes de la floración mediante el uso de RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) y se utilizó como molde para preparar ADNc mediante SuperscriptII First-Strand Synthesis System (Invitrogen). A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR mediante el uso de este ADNc como molde. Aunque se ha informado sobre los genes CHI de diversas plantas (Núms. de acceso de GenBank: AY700850, AY086088, DQ160231, AJ004902, AF474923, XM_470129, U03433 y AB187026), en la PCR se utilizaron como cebadores CHI-dgF1 (5'-TTYCTCGSYGGBGCMGGYGWVMGVGG-3'; SEC ID NO: 25) y CHI-dgR1 (5'-CMGGIGAIACVSCRTKYTYICCRATVAT-3'; SEC ID NO: 26) diseñados a partir del gen CHI conocido convencionalmente. En la reacción, etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. Adicionalmente, se llevó a cabo una PCR Anidada mediante el uso de la disolución de reacción resultante como molde, un cebador CHI-dgF3 (5'-TMIKYWCMGGISMITYGARAARYT-3'; SEC ID NO: 27) y un cebador CHI-dgR3 (5'-TYICCRATVATIGWHTCCARIAYBGC-3'; SEQ ID NO: 28). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener PhCHIfrag 16, y se determinó una secuencia de ADN parcial de PhCHIfrag 16 (secuencia parcial PhCHI).

A partir de la secuencia parcial PhCHI, se analizaron la secuencia 3' y la secuencia 5' mediante RACE. Se llevó a cabo RACE 3' mediante el uso de un cebador diseñado a partir de la secuencia parcial PhCHI, el ARN anteriormente mencionado y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la PCR fueron PhCHI GSP-F1 (5'-ATGCTGCTGCCATTAACGGGTCA-3'; SEC ID NO: 29) y el cebador GeneRacer 3'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. Adicionalmente, se llevó a cabo la PCR Anidada mediante el uso de la disolución de reacción resultante como molde, un cebador PhCHI GSP-F2 (5'-TCCGAGAAGGTCTCCGGGAAC-3'; SEC ID NO: 30) y cebador Anidado GeneRacer 3'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener PhCHI3'RACE23. Se determinó la secuencia de ADN 3' de PhCHI3'RACE23 (secuencia PhCHI3'RACE).

Se llevó a cabo RACE5' mediante el uso de un cebador diseñado a partir de la secuencia parcial PhCHI, el ARN anteriormente mencionado y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la PCR fueron PhCHI GSP-R1 (5'-GCATTCGTCAGCTTCTTGCTCTCT-3'; SEC ID NO: 31) y cebador GeneRacer 5'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. Adicionalmente, se llevó a cabo la PCR Anidada mediante el uso de la disolución de reacción resultante como molde, un cebador PhCHI GSP-R2 (5'-ATCACATCAGTCTCAGCCACA-3'; SEC ID NO: 32) y un cebador anidado GeneRacer 5'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener PhCHI5'RACE54. Se determinó la secuencia ADN 5' de PhCHI5'RACE54 (secuencia PhCHI5'RACE).

La longitud total del gen CHI de la orquídea polilla (PhCHI) se clonó basándose en la secuencia PhCHI3'RACE y la secuencia PhCHI5'RACE. La PCR se llevó a cabo utilizando el ADNc mencionado anteriormente, un cebador PhCHI inic (5'-ATGGCAGAAACAGTGGCGACGCCCA-3'; SEC ID NO: 33) y un cebador PhCHI term (5'-TCAAACGACTCCATCTTGCTC-3'; SEC ID NO: 34). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 45 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en el sitio Swal de pBS-P35T35 para obtener p35PhCHI1. A continuación, se determinó la secuencia de ADN del gen CHI de la orquídea polilla completo en p35PhCHI1 (PhCHI1, SEC ID NO: 35), y se encontró que el gen que tenía la secuencia de la orquídea polilla era novedoso. El análisis de homología indicó que la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN tiene una homología de 54% con la secuencia de aminoácidos (Núm. de acceso GenBank: DQ120521) codificada por el gen CHI de la planta de té. p35PhCHI1 es el ADN para la expresión del gen CHI de la orquídea polilla en células vegetales.

(3) Aislamiento del gen F3H de la orquídea polilla (PhF3H1)

El ARN total se aisló de los pétalos de orquídea polilla (*Dtps. Sogo Vivien* × *Dtps. Sogo Yenlin*) inmediatamente antes de la floración mediante el uso de RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) y se utilizó como molde para preparar ADNc mediante SuperscriptIII First-Strand Synthesis System (Invitrogen). A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR mediante el uso de este ADNc como molde. Aunque se ha informado sobre los genes F3H de diversas plantas (Núms. de acceso GenBank: DQ394303, AY221246, AJ493133, AY641730, AF184270, AB078956, AB201760, AY669324, AF036093, AB211958, AB187027 y AB234905), en la PCR, se utilizaron como cebadores un cebador F3H-dgF1 (5'-TIVGIGAYGARGABGARMGBCCIAA-3'; SEC ID NO: 37) y un cebador F3H-dgR1 (5'-ACBGCYYGRTGRTCHGCRRTTCTTAA-3'; SEC ID NO: 38) diseñados a partir del gen F3H conocido convencionalmente. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 5 ciclos, una etapa de 94°C durante 30 segundos, y 70°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. Adicionalmente, se llevó a cabo la PCR Anidada mediante el uso de la disolución de reacción resultante como molde, un cebador F3H-dgF3 (5'-AARYTBRGKTTYGAYATGWCHGGIG-3'; SEC ID NO: 39) y un cebador F3H-dgR3 (5'-GGHWSRACVGTDATCCAIGWBTT-3'; SEQ ID NO: 40). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener PhF3Hfrag 26, y se determinó una secuencia de ADN parcial de PhF3Hfrag 26 (secuencia parcial PhF3H).

A partir de la secuencia parcial PhF3H- se analizaron la secuencia 3' y la secuencia 5' mediante RACE. Se llevó a cabo RACE3' mediante el uso de un cebador diseñado a partir de la secuencia parcial PhF3H, el ARN anteriormente mencionado y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la PCR fueron PhF3H-GSPF1 (5'-TTCTCATACCCAATCGGGAG-3'; SEC ID NO: 41) y el cebador GeneRacer 3'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 5 ciclos, y una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. Adicionalmente, se llevó a cabo la PCR Anidada mediante el uso de la disolución de reacción resultante, un cebador PhF3H GSP-F2 (5'-AATCGGGAGCCGCGATTACT-3'; SEC ID NO: 42) y el cebador Anidado GeneRacer 3'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener PhF3H3'RACE33. Se determinó la secuencia de ADN 3' de PhF3H3'RACE33 (secuencia PhF3H 3'RACE).

Se llevó a cabo RACE5' mediante el uso de un cebador diseñado a partir de la secuencia parcial PhF3H, el ARN anteriormente mencionado y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la PCR fueron PhF3H-GSPR1 (5'-TCTGTGTGGCGCTTCAGGCC-3'; SEC ID NO: 43) y el cebador GeneRacer 5'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 5 ciclos, y una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. Adicionalmente, se llevó a cabo la PCR Anidada mediante el uso de la disolución de reacción resultante, PhF3H-GSP R2 (5'-TGAGGTCCGGTTGCGGGCATT-3'; SEC ID NO: 44) y el cebador Anidado GeneRacer 5'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener PhF3H5'RACE86. Se determinó la secuencia de ADN 5' de PhF3H5'RACE86 (secuencia PhF3H 5'RACE).

La longitud total del gen F3H de la orquídea polilla se clonó basándose en la secuencia PhF3H 3'RACE y la secuencia PhF3H 5'RACE. La PCR se llevó a cabo mediante el uso del ADNc mencionado, un cebador PhF3H inic. (5'-ATGGCCCAATACCATCTACCGA-3'; SEC ID NO: 45) y un cebador PhF3H term. (5'-CCTTAAGCTAAAATCTCATTTAATGCCTTTGCTCC-3'; SEC ID NO: 46). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 40 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en el sitio SwaI de pBS-P35T35 para obtener p35PhF3H1. A continuación, se determinó la secuencia de ADN del gen F3H de la orquídea polilla completo en p35PhF3H1 (PhF3H1; SEQ ID NO: 9), y se encontró que el gen que tenía la secuencia de la orquídea polilla era novedoso. El análisis de homología indicó que la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN tiene una homología de 86% con la secuencia de aminoácidos (Núm. de acceso GenBank: X89199) codificada por el gen de F3H de *Bromheadia finlaysoniana*. p35PhF3H1 es el ADN para la expresión del gen F3H de la orquídea polilla en células vegetales.

(4) Aislamiento de gen F3'H de la orquídea polilla (PhF3'H)

Se aisló el ARN total de pétalos de una yema de orquídea polilla (*Dtps. Queen Beer* 'Mantenkou') inmediatamente antes de la floración mediante el uso de RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) y se utilizó como molde para preparar ADNc mediante SuperscriptIII First-Strand Synthesis System (Invitrogen). A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR mediante el uso de este ADNc como molde. Aunque se ha informado sobre los genes F3'H de diversas plantas (Núms. de acceso GenBank: AAG49298, ABA64468, BAE47004, BAE47005, BAE47006, BAE71221, BAE72874, CAI54278 y NP_920627), en la PCR, se utilizaron como cebadores un cebador F3HDF3 (5'-

GCITAYAAAYTAYCARGAYYTIGTNTT-3'; SEQ ID NO: 47) y un cebador F3HD-R4-2 (5'-GCICKYTGARIIGNARNCC-3'; SEC ID NO: 48) diseñados a partir de los genes F3'H anteriormente mencionados. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 48°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 40 ciclos. Adicionalmente, se llevó a cabo la PCR Anidada mediante el uso de la disolución de reacción resultante, un cebador F3HDF4 (5'-GAYYTIGTNTTYGICCCNTAYGG-3'; SEC ID NO: 49) y un cebador F3HD-R3-2 (5'-DATICKICKICGICNCRAANGG-3'; SEC ID NO: 50). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 48°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 35 ciclos. La PCR Anidada se llevó a cabo de nuevo utilizando la disolución de reacción resultante, un cebador F3HDF5 (5'-GARTTYAARIIIATGGTIGTIGARYrNATG-3'; SEC ID NO: 51) y un cebador F3HD-R1-3 (5'-GGRTCICKNGCDATNGCCC-3'; SEC ID NO: 52). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 48°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos se repitió 35 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) y se designó PhF3'H-D/pCR4. Se determinó una secuencia de ADN parcial de PhF3'H-D/pCR4 (secuencia parcial PhF3'H).

A partir de la secuencia parcial PhF3'H se analizaron la secuencia 3' y la secuencia 5' mediante RACE.

Se llevó a cabo RACE3' mediante el uso de un cebador diseñado a partir de la secuencia parcial PhF3'H, el ARN anteriormente mencionado y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la PCR fueron PhF3dH-F7 (5'-AGGGCGAAGTTAATGGTGGAGGCAGTGATA-3'; SEC ID NO: 53) y el cebador GeneRacer 3'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos se repitió 5 ciclos, y una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 2 minutos se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos se repitió 25 ciclos. La PCR Anidada se llevó a cabo mediante el uso de la disolución de reacción resultante, un cebador PhF3dH-F8 (5'-AAGTTAATGGTGGAGGCAGTGATATGCTGA-3'; SEC ID NO: 54) y el cebador Anidado GeneRacer 3'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos se repitió 25 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) y se designó PhF3'H 3'RACE/pCR4. Se determinó la secuencia de ADN 3' de PhF3'H 3'RACE/pCR4 (secuencia PhF3'H 3'RACE).

Se llevó a cabo RACE5' mediante el uso de un cebador diseñado a partir de la secuencia parcial PhF3'H, el ARN anteriormente mencionado y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la PCR fueron PhF3dH-R6 (5'-CACTGCCTCCACCATTAACCTTCGCCCTTCT-3'; SEC ID NO: 55) y el cebador GeneRacer 5'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 5 ciclos, y una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. La PCR Anidada se llevó a cabo mediante el uso de la disolución de reacción resultante, un cebador PhF3dH-R5 (5'-CCTCCACCATTAACCTTCGCCCTTCTCTATT-3'; SEC ID NO: 56) y el cebador Anidado GeneRacer 5'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) y se designó PhF3'H 5'RACE/pCR4. Se determinó la secuencia de ADN 5' de PhF3'H 5'RACE/pCR4 (secuencia PhF3'H 5'RACE).

La longitud total del gen PhF3'H se clonó basándose en la secuencia de PhF3'H 3'RACE y la secuencia PhF3'H 5'RACE. La RT-PCR se llevó a cabo mediante el uso del ARN anteriormente mencionado, un hexámero al azar, un cebador PhF3dH-F11E4 (5'-AAGAAGCAAATGGCATTCTTAACCTACCTG-3'; SEC ID NO: 57) y un cebador PhF3dH-R7G11 (5'-TTATCACTGCCTCCACCATTAACCTTCGCC-3'; SEC ID NO: 58) y Ready-To-Go You Prime First Strand Beads (Amersham Biosciences). En la reacción, una etapa de 98°C durante 10 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 35 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) y se designó PhF3'H/pCR4. Se determinó la secuencia de ADN del gen PhF3'H en PhF3'H/pCR4 (PhF3'H; SEQ ID NO: 1), y se encontró que el gen que tenía la secuencia de la orquídea polilla era novedoso. El Análisis de homología indicó que la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN tiene una homología de 59% con la secuencia de aminoácidos (Núm. de acceso GenBank: DQ787855) codificada por el gen de F3'H de Sorghum bicolor. Se cortó PhF3'H/pCR4 con EcoRI, y el extremo cohesivo del fragmento de ADN del plásmido se volvió romo con el fragmento de Klenow. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión de Swal de pBS-P35T35 y clones se escrutaron para determinar el ADNc insertado en la dirección efectora para construir pBS-35S-PhF3'H. pBS-35S-PhF3'H es el ADN para la expresión del gen F3'H de la orquídea polilla en células vegetales.

(5) Aislamiento del gen DFR de la orquídea polilla (PhDFR)

El ARN total se aisló de pétalos en una yema de orquídea polilla (*Dtps. Queen Beer 'Mantenkou'*) mediante el uso de RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) y se utilizó como molde para preparar ADNc mediante el kit GeneRacer (Invitrogen). A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR mediante el uso de este ADNc como molde. Aunque se ha informado sobre los genes DFR de diversas plantas (Núms. de acceso GenBank: AAB62873, AAC17843, AAD49343, AAQ83576, AAU93766, AAY32600, AAY32601, AAY32602, BAB40789 y BAE79202), en la PCR, se utilizaron como cebadores DFRD-F1 (5'-TTYCAYGTIGCIACNCCNATG-3'; SEQ ID NO: 59) y DFRD-R1 (5'-DATNGCRTCRTCRAACATYTC-3'; SEC ID NO: 60) diseñados a partir de la secuencia de los genes DFR

mencionados anteriormente. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 48°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 40 ciclos. La PCR Anidada se llevó a cabo mediante el uso de la disolución de reacción resultante como molde, un cebador DFRD-F2 (5'-ATGAAYTTYCARWSIRARGAYCC-3'; SEC ID NO: 61) y un cebador DFRD-R2 (5'-RCAIATRTAICKNCIRTTNGC-3'; SEC ID NO: 62). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 48°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 40 ciclos. Adicionalmente, se llevó a cabo la PCR Anidada de nuevo utilizando la disolución de reacción resultante como molde, un cebador DFRD-F3 (5'-GARAAYGARGTNATHAARCC-3'; SEC ID NO: 63) y un cebador DFRD-R3 (5'-RTCRTCIARRTGNACRAAYTG-3'; SEC ID NO: 64). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 48°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos se repitió 40 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4/TOPO (Invitrogen) para obtener PhDFR-D/pCR4, y se determinó una secuencia de ADN parcial de PhDFR-D/pCR4 (secuencia parcial PhDFR).

A partir de la secuencia parcial de PhDFR, se analizaron la secuencia 3' y la secuencia 5' mediante RACE.

Se llevó a cabo RACE3' mediante el uso de un cebador diseñado a partir de la secuencia parcial PhDFR, el ARN anteriormente mencionado y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados para la PCR fueron PhDFR-F1 (5'-GGTCATGCAAAGGTCGGGCAGCGTAA-3'; SEC ID NO: 65) y el cebador GeneRacer 3'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. Adicionalmente, se llevó a cabo la PCR Anidada mediante el uso de la disolución de reacción resultante como molde, un cebador PhDFR-F2 (5'-GTGATCTTCACATCTTCCGCAGGAACAGT-3'; SEC ID NO: 66) y el cebador Anidado GeneRacer 3'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4/TOP010 (Invitrogen) para obtener PhDFR3'RACE/pCR4, y se determinó la secuencia de ADN 3' de PhDFR3'RACE/pCR4 (secuencia PhDFR3'RACE).

Se llevó a cabo RACE5' mediante el uso de un cebador diseñado a partir de la secuencia parcial de PhDFR, el ARN anteriormente mencionado y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la PCR fueron PhDFR-R4 (5'-ATGATTCATTAATAAATCCGAAAAAAGACCACTACAA-3'; SEC ID NO: 67) y el cebador GeneRacer 5'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1 minuto se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. Adicionalmente, se llevó a cabo la PCR Anidada mediante el uso de la disolución de reacción resultante como molde, un cebador PhDFR-R3 (5'-AACCATGCATAATAAGCAGATGTGTAAT-3'; SEC ID NO: 68) y el cebador Anidado GeneRacer 5'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 25 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4/TOPO (Invitrogen) para obtener PhDFR 5'RACE/pCR4, y se determinó la secuencia de ADN 5' de PhDFR 5'RACE/pCR4 (secuencia PhDFR 5'RACE).

La longitud total del gen DFR de la orquídea polilla se clonó basándose en la secuencia PhDFR3'RACE y la secuencia PhDFR 5'RACE. La RT-PCR se llevó a cabo mediante el uso del ARN anteriormente mencionado, un cebador PhDFR-F8A5 (5'-AAAAAATGGAGGATGTGAGGAAGGGTCTGTT-3'; SEC ID NO: 69), un cebador PhDFR-R5 (5'-ACATGATTCATTAATAAATCCGAAAAAAGACCA-3'; SEC ID NO: 70) y Ready-To-Go You Prime First Strand Beads (Amersham Biosciences). En la reacción, una etapa de 98°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 35 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pBS-P35T35 para obtener p35PhDFR. A continuación, se determinó la secuencia de ADN del gen DFR de la orquídea polilla completo en p35PhDFR (PhDFR; SEQ ID NO: 15), y se encontró que el gen que tenía la secuencia de la orquídea polilla era novedoso. El análisis de homología indicó que la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN tiene una homología de 86% con la secuencia de aminoácidos (Núms. de acceso GenBank: AF007096) codificada por el gen DFR de *Bromheadia finlaysoniana*. p35PhDFR es el ADN para la expresión del gen DFR de la orquídea polilla en células vegetales.

(6) Aislamiento del gen ANS de la orquídea polilla (PhANS1)

El ARN total se aisló de los pétalos de orquídea polilla (*Dtps. Sogo VivienxDtps. Sogo Yen/in*) inmediatamente antes de la floración mediante el uso de RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) y se utilizó como molde para preparar ADNc mediante SuperscriptII First-Strand Synthesis System (Invitrogen). A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR mediante el uso de este ADNc como molde. En la PCR, se utilizaron como cebadores un cebador ANS-dgF2 (5'-TICARGGBTAYGGIAGYARRYTIGCIRMYA-3'; SEC ID NO: 71) y ANS-dgR2 (5'-GGYTCRCARAAIAYIRCCCAIGADA-3'; SEC ID NO: 72) diseñados a partir de un gen ANS conocido. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 40 ciclos. Mediante el uso de la disolución de reacción resultante como molde y los mismos cebadores de nuevo, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 30 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4/TOPO (Invitrogen) para obtener PhANSfrag10, y se determinó una secuencia de ADN parcial de PhANSfrag10 (secuencia parcial PhANS).

A partir de la secuencia parcial de PhANS, se analizaron la secuencia 3' y la secuencia 5' mediante RACE.

5 Se llevó a cabo RACE3' mediante el uso de un cebador diseñado a partir de la secuencia parcial de PhANS, el ARN anteriormente mencionado y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la PCR fueron PhANS3RACEGSP1 (5'-GCCCCACACCGACGTCAGCTCCCTCTCCT-3'; SEC ID NO: 73) y el cebador GeneRacer 3'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 5 ciclos, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1,5 minutos se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 25 ciclos. Adicionalmente, se
10 llevó a cabo la PCR Anidada mediante el uso de la disolución de reacción resultante como molde, un cebador PhANS3RACEGSP2 (5'-CGTCGGGGATGCGCTCGAGATCCTCAGC-3'; SEQ ID NO: 74) y el cebador Anidado GeneRacer 3'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 10 segundos, 58°C durante 10 segundos y 72°C durante 1 minuto, se repitió 35 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4/TOPO (Invitrogen) para obtener PhANS3'RACE37, y se determinó la secuencia de ADN 3' de PhANS3'RACE37 (secuencia PhANS3'RACE).

15 Se llevó a cabo RACE5' mediante el uso de un cebador diseñado a partir de la secuencia parcial de PhANS, el ARN anteriormente mencionado y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la reacción de PCR fueron PhANS5RACEGSP1 (5'-AGTCCGCGGGTTCAGTCGGCCAGATGGT-3'; SEC ID NO: 75) y el cebador GeneRacer 5'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 5 ciclos, una etapa de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1,5 minutos se repitió 5 ciclos, y a continuación una etapa de 94°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 25 ciclos. La PCR Anidada se llevó a cabo mediante el uso de la disolución de reacción resultante como molde, un cebador PhANS5RACEGSP2 (5'-CCGTCTTCTCCGGCGGGTAGACGAGGTG-3'; SEC ID NO: 76) y el cebador Anidado GeneRacer 5'. En la reacción, una etapa de 94°C durante 10 segundos, 58°C durante 10 segundos y 72°C durante 1
20 minuto, se repitió 35 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en pCR4/TOPO (Invitrogen) para obtener PhANS5'RACE15, y se determinó la secuencia de ADN 5' de PhANS5'RACE15 (secuencia PhANS 5'RACE).

30 La longitud total del gen ANS de la orquídea polilla se clonó basándose en la secuencia PhANS3'RACE y la secuencia PhANS 5'RACE. La PCR se llevó a cabo utilizando el ADNc mencionado anteriormente, un cebador de PhANS inic (5'-ATGGCCACCAAAGCAATCCCACC-3'; SEC ID NO: 77), y un cebador de PhANS term (5'-TCAATCCACAGGCGCCTTCT-3'; SEQ ID NO: 78). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 69°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 35 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en el sitio Swal de pBS-P35T35 para obtener p35PhANS1. A continuación, se determinó la secuencia de ADN del gen ANS completo (PhANS1) en p35PhANS1 (PhANS1; SEQ ID NO: 11), y se encontró que el gen que tenía la secuencia de la orquídea polilla era novedoso. El análisis de homología indicó que la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN tiene una homología de 58% con la secuencia de aminoácidos (Núm. de acceso GenBank: EF079869) codificada por el gen ANS de Anthurium. p35PhANS1 es el ADN para la expresión del gen ANS de la orquídea polilla en células vegetales.

40 Ejemplo 4: Aislamiento de los genes F3'H, DFR y ANS de Gerbera y preparación de un vector de expresión

(1) Aislamiento del gen F3'H de Gerbera (GerF3'H)

45 El ARN total se aisló de pétalos de una yema de un híbrido de Gerbera disponible en el mercado y se utilizó como molde para preparar ADNc mediante SuperscriptII First-Strand Synthesis System (Invitrogen). A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR mediante el uso de este ADNc como molde. En la PCR, se utilizaron como cebadores GerF3H-F (5'-ATGACGCCTTTAACGCTCCT-3'; SEC ID NO: 79) y GerF3H-R (5'-CTAGACCTTAGTCGTCATATACATG-3'; SEC ID NO: 80) diseñados a partir de una secuencia del gen F3'H de Gerbera conocido (GerF3'H) (Núms. de acceso GenBank: Z17221). En la reacción, una etapa de 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 10 segundos y 72°C durante 1,5 minutos se repitió 45 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en el sitio Swal de pBS-P35T35 (p35GerF3'H) para obtener el gen F3'H de Gerbera (SEQ ID NO: 3). p35GerF3'H es el ADN para expresar el gen F3'H de Gerbera en células vegetales.

55 (2) Aislamiento del gen DFR de Gerbera (GerDFR)

60 La RT-PCR se llevó a cabo utilizando el ADNc obtenido en el Ejemplo 4(1) como molde. En la PCR, se utilizaron como cebadores GerDFR-F (5'-ATGGAAGAGGATTCTCCGGC-3, SEC ID NO: 81) y GerDFR-R (5'-CTATTGGCCTTCTTTTGAACAACAAA-3'; SEC ID NO: 82) diseñados a partir de una secuencia del gen DFR de Gerbera conocido (GerDFR) (número de acceso GenBank: Z17221). La reacción se llevó a cabo mediante la repetición de una etapa de 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 10 segundos y 72°C durante 1 minuto y 30 segundos 45 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en el sitio Swal de pBS-P35T35 para obtener un gen DFR de Gerbera (p35GerDFR) (SEC ID NO: 7). p35GerDFR es el ADN para expresar el gen DFR de Gerbera en células vegetales.

(3) Aislamiento del gen ANS de Gerbera (GerANS)

La RT-PCR se llevó a cabo utilizando el ADNc obtenido en el Ejemplo 4 (1) como molde. En la PCR, se utilizaron como cebadores GerANS-F (5'-ATGGTGATTCAAGCAACCACA-3'; SEC ID NO: 83) y GerANS-R (5'-CTAGTTTTGCATCACTTCGTCTTTAT-3'; SEC ID NO: 84) diseñados a partir de la secuencia del gen ANS de Gerbera conocido (GerANS) (Núm. de acceso GenBank: AY997842). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y 10 segundos se repitió 45 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en el sitio Swal de pBS-P35T35 para obtener el gen ANS de Gerbera (p35GerANS) (SEC ID NO: 13). p35GerANS es el ADN para expresar el gen Gerbera ANS en células vegetales.

Ejemplo 5: Aislamiento de los genes F3'H y DFR de Torenia y la preparación de un vector de expresión

(1) Aislamiento del gen de F3'H de Torenia (TorF3'H)

El ARN total se aisló de los pétalos de una yema de una Torenia disponible en el mercado (*Torenia fournieri*) y se utiliza como el molde para preparar ADNc mediante SuperscriptII First-Strand Synthesis System (Invitrogen). A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR mediante el uso de este ADNc como molde. En la reacción de PCR, se utilizaron como cebadores TorF3H1-F (5'-ATGAGTCCCTTAGCCTTGATGAT-3'; SEC ID NO: 85) y TorF3H1-R (5'-TTAATAGACATGAGTGGCCAACC-3'; SEC ID NO: 86), diseñados a partir de una secuencia del gen F3'H de Torenia conocido (TorF3'H) (Acceso GenBank AB057672). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y 10 segundos se repitió 45 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en el sitio Swal de pBS-P35T35 para obtener un gen F3'H de Torenia (p35TorF3'H) (SEC ID NO: 87). p35TorF3'H es el ADN para expresar el gen F3'H de Torenia en células vegetales.

(2) Aislamiento del gen DFR de Torenia (TorDFR)

La RT-PCR se llevó a cabo utilizando el ADNc obtenido en el Ejemplo 5(1) como molde. En la PCR, se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos TorDFR-F (5'-ATGAGCATGGAAGTAGTAGTACCA-3'; SEC ID NO: 89) y TorDFR-R (5'-CTATTCTATCTTATGTTCTCCATGG-3'; SEC ID NO: 90) diseñados a partir de una secuencia del gen DFR de Torenia conocido (TorDFR) (Acceso GenBank AB012924). En la reacción, una etapa de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y 10 segundos se repitió 45 ciclos. El producto de reacción resultante se clonó en el sitio Swal de pBS-P35T35 para obtener un gen DFR de Torenia (p35TorDFR) (SEC ID NO: 5). p35TorDFR es el ADN para expresar el gen DFR de Torenia en células vegetales.

Ejemplo 6: Observación de la coloración de las células de los pétalos

Se observó la coloración de los pétalos y las células de los pétalos bajo un microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus Corporation) y a simple vista y se evaluó en una escala de grados de coloración. Los pétalos con coloración visible a simple vista se calificaron como "III", aquellos con coloración reconocible microscópicamente a un aumento de a lo sumo 32 veces se calificaron como "II", aquellos con coloración reconocible microscópicamente con un aumento de al menos 32 veces fueron calificados como "I", y aquellos sin coloración reconocible se calificaron como "-".

Ejemplo 7: Identificación de los genes requeridos para cambiar el color de la flor de una orquídea polilla de blanco a rojo

Los pétalos de una orquídea polilla blanca (*Phal. amabilis*) se transfectaron con los siguientes cuatro conjuntos de genes mediante el método del Ejemplo 1, y se observaron los grados de coloración de los pétalos de acuerdo con el Ejemplo 6 para identificar los genes requeridos para cambiar el color de la flor.

1. (1) gen F3'H de Gerbera (GerF3'H) + gen DFR de Gerbera (GerDFR) + gen ANS de Gerbera (GerANS)
2. (2) gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen F3'H de Gerbera (GerF3'H) + gen DFR de Gerbera (GerDFR) + gen ANS de Gerbera (GerANS)
3. (3) gen CHI de orquídea polilla (PhCHL1) + gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen F3'H de Gerbera (GerF3'H) + gen DFR de Gerbera (GerDFR) + gen ANS de Gerbera (GerANS)
4. (4) gen CHS de orquídea polilla (PhCHS3) + gen CHL de orquídea polilla (PhCHL1) + gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen F3'H de Gerbera (GerF3'H) + gen DFR de Gerbera (GerDFR) + gen ANS de Gerbera (GerANS)

Los pétalos de *Phal. amabilis* se transfectaron con los conjuntos de genes, y se observó la coloración de las células en el pétalo tratado con el conjunto anterior. Las células rojas aparecieron en los pétalos transfectadas con todos los conjuntos de genes, excepto (1) (Fig. 3). Los resultados indican que con el fin de cambiar los pétalos a rojo, la transfección con el gen de F3'H + gen DFR + gen ANS es insuficiente, y es necesaria la transfección con al menos cuatro genes, incluyendo el gen F3H además de ellos.

Estudio del mejor gen F3'H, gen DFR y gen ANS

Con el fin de encontrar el mejor gen F3'H, gen DFR y gen ANS para cambiar la orquídea polilla de color blanco a rojo, se introdujeron diferentes genes vegetales y se compararon.

5 Ejemplo 8: Comparación de los genes F3'H introducidos en pétalos de orquídea polilla blanca

Los pétalos de una orquídea polilla blanca (*Phal. amabilis*) se transfectaron con los siguientes tres conjuntos de genes que incluían cada uno un gen de F3'H diferente, y se observaron los grados de coloración.

- 10 1. (1) gen F3'H de orquídea polilla (PhF3'H) + gen CHS de orquídea polilla (PhCHS3) + gen CHL de orquídea polilla (PhCHL1) + gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen DFR de Torenia (TorDFR) + gen ANS de orquídea polilla (PhANS1)
- 15 2. (2) gen F3'H de Gerbera (GerF3'H) + gen CHS de orquídea polilla (PhCHS3) + gen CHL de orquídea polilla (PhCHL1) + gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen DFR de Torenia (TorDFR) + gen ANS de orquídea polilla (PhANS1)
3. (3) gen F3'H de Torenia (TorF3'H) + gen CHS de orquídea polilla (PhCHS3) + gen CHL de orquídea polilla (PhCHL1) + gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen DFR de Torenia (TorDFR) + gen ANS de orquídea polilla (PhANS1)

20 Como resultado, aparecieron células rojas en los pétalos transfectados con cada conjunto. El grado de coloración de diez pétalos transfectados con cada conjunto se muestra en la Fig. 4. El grado de coloración roja disminuyó en el orden de orquídea polilla (PhF3'H), Gerbera (GerF3'H) y Torenia (TorF3'H). Para la producción de una flor de color rojo oscuro, se prefieren los genes de orquídea polilla (PhF3'H) y Gerbera (GerF3'H), y en especial se prefiere el gen F3'H de orquídea polilla (PhF3'H).

25 Ejemplo 9: Comparación de los genes DFR introducidos en pétalos de orquídea polilla blanca

Los pétalos de una orquídea polilla blanca (*Phal. amabilis*) se transfectaron con los siguientes tres conjuntos de genes que incluían cada uno un gen DFR diferente, y se observaron los grados de coloración.

- 30 1. (1) gen DFR de orquídea polilla (PhDFR) + gen CHS de orquídea polilla (PhCHS3) + gen CHL de orquídea polilla (PhCHL1) + gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen F3'H de Gerbera (GerF3'H) + gen ANS de Gerbera (GerANS)
- 35 2. (2) gen DFR de Gerbera (GerDFR) + gen CHS de orquídea polilla (PhCHS3) + gen CHL de orquídea polilla (PhCHL1) + gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen F3'H de Gerbera (GerF3'H) + gen ANS de Gerbera (GerANS)
3. (3) gen DFR de Torenia (TorDFR) + gen CHS de orquídea polilla (PhCHS3) + gen CHL de orquídea polilla (PhCHL1) + gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen F3'H de Gerbera (GerF3'H) + gen ANS de Gerbera (GerANS)

40 Como resultado, aparecieron células rojas en los pétalos transfectados con cada conjunto. El grado de coloración de 36 pétalos transfectados con cada conjunto se muestra en la Fig. 5. El grado de coloración roja disminuyó en el orden Torenia (TorDFR), Gerbera (GerDFR) y orquídea polilla (PhDFR). Para la producción de una flor de color rojo oscuro, se prefieren los genes de Torenia (TorDFR) y Gerbera (GerDFR) al gen DFR de orquídea polilla endógeno (PhDFR), y especialmente, se prefiere el gen DFR de Torenia (TorDFR).

45 Ejemplo 10: Comparación de los genes ANS introducidos en pétalos de orquídea polilla blanca

Los pétalos de una orquídea polilla blanca (*Phal. amabilis*) se transfectaron con los siguientes dos conjuntos de genes que incluían cada uno un gen ANS diferente, y se observaron los grados de coloración.

- 50 1. (1) gen ANS de orquídea polilla (PhANS1) + gen CHS de orquídea polilla (PhCHS3) + gen CHI de orquídea polilla (PhCHI1) + gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen F3'H de Gerbera (GerF3'H) + gen DFR de Gerbera (GerDFR)
- 55 2. (2) gen ANS de Gerbera (GerANS) + gen CHS de orquídea polilla (PhCHS3) + gen CHI de orquídea polilla (PhCHI1) + gen F3H de orquídea polilla (PhF3H1) + gen F3'H de Gerbera (GerF3'H) + gen DFR de Gerbera (GerDFR)

Como resultado, aparecieron células rojas en los pétalos transfectados con cada conjunto. El grado de coloración de las células en 16 pétalos transfectados con cada conjunto se muestra en la Fig. 6.

60 Ejemplo 11: Aplicación a la orquídea polilla blanca distinta de *Phal. amabilis*

Los pétalos de una yema de 1,7 cm de longitud de una orquídea polilla grande de color blanco puro comercial se cotransfectaron con los genes CHS, CHL y F3H de una orquídea polilla (PhCHS3, PhCHL1 y PhF3H1) y los genes F3'H, DFR y ANS de Gerbera (GerF3'H, GerDFR y GerANS), y aparecieron muchas células rojas en los pétalos.

Ejemplo 12: Preparación de ADN para la transformación de polilla orquídea mediante transformación mediada por *Agrobacterium*

La transformación de orquídeas polilla se puede llevar a cabo mediante transformación mediada por *Agrobacterium*, así como bombardeo con microproyectiles (Belarmino y Mii, *Plant Cell Reports* (2000) 19:435-442., Mishiba et al., *Plant Cell Reports* (2005) 24: 297-303). Se construyeron los ADN transformantes para la producción de plantas transgénicas mediante estos métodos. Los mapas de estos plásmidos y los procedimientos para su preparación se muestran en las Figs. 7 y 8.

(1) Construcción de PBI-SAS1

Un fragmento corto NotI-HindIII de pBS-SAS del Ejemplo 2 se subclonó entre los sitios NotI y HindIII de PBI-RHL descrito en el documento PCT/JP02/12268 para la construcción de PBI-SAS1. PBI-SAS1 es un plásmido que confiere resistencia a la higromicina a las plantas mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

(2) Construcción de pBS-35S-FT

Dado que se requiere un período de al menos un año para la floración de las orquídeas polilla, se construyó el ADN para expresar el gen FT de floración (Kobayashi et al., *Science* (1999) 286: 1960-1962) en orquídeas polilla.

Se preparó el ADNc de a partir del ARN total aislado a partir del cuerpo íntegro de *Arabidopsis* mediante amplificación por RT-PCR. Para la PCR, se utilizaron como cebadores AtFT 2nd-F (5'-GAAACCACCTGTTTGTCAAGA-3'; SEC ID NO: 91) y AtFT 2nd-R (5'-TCAATTGGTTATAAAGGAAGAAGC-3'; SEC ID NO: 92), y el ADNc de FT se insertó en el sitio Swal de pBS-P35T35. Los clones que portaban el inserto de ADNc en la dirección efectora se seleccionaron para la construcción de pBS-P35S-FT. En el plásmido pBS-35S-FT, la transcripción de FT está regulada por el promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

(3) Construcción de pBS-35S-mPhF3'H

Se introdujeron sustituciones de nucleótidos en los dos sitios SphI del ADNc de PhF3'H sin sustitución de aminoácidos, y el ADNc resultante resistente a SphI se insertó en pBS-P35T35. Las sustituciones de nucleótidos se llevaron a cabo mediante PCR utilizando como cebadores PhF3dH-367F (5'-CGGTGCGCGGTGGCGTATGCTGAGGCGT-3'; SEC ID NO: 93) y PhF3dH-394R (5'-ACGCCTCAGCATACGCCACCGCGCACCG-3'; SEC ID NO: 94) y pBS-35S-PhF3'H como molde. El producto de PCR se trató con el fragmento de Klenow y se cicló. La PCR se llevó a cabo utilizando el ADN circular resultante como molde y PhF3dH-F11E4 (SEQ ID NO: 57) y PhF3dH-R7G12 (5'-CACCCCTTGCATAAATTTATGACATCAAGC-3, SEC ID NO: 95) como cebadores. El producto de PCR resultante se insertó en el sitio de corte Swal de pBS-P35T35, y se seleccionaron los clones que portaban el inserto de ADNc en la dirección efectora para la construcción de pBS-35S-mPhF3'H.

(4) Construcción de pBS-35S-mPhCHS3

Se introdujo una sustitución de nucleótido en el sitio SphI del ADNc de PhCHS3 sin sustitución de aminoácidos para preparar un ADNc resistente a SphI. La sustitución de nucleótidos se llevó a cabo mediante síntesis de ADN utilizando como cebadores PhCHS3-1038F (5'-GTAACATGTCGAGCGCTTGCCTTCTTTTCATACTCG-3'; SEC ID NO: 96) y PhCHS3-1073R (5'-CGAGTATGAAAAGAAGCAAGCGCTCGACATGTTAC-3'; SEC ID NO: 97) y p35PhCHS3 como molde y Pyrobest (Takara Bio Inc.). A continuación, el plásmido molde se digirió mediante tratamiento con DpnI para la construcción de pBS-35S-mPhCHS3.

(5) Construcción de pBS-35S-UP1

Se cortó p35PhCHI1 con AscI, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con SphI para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión SphI de p35PhF3H1 para la construcción de pBS-35S-UP1, después se cortó p35PhF3H1 con XbaI y volvió romo con el fragmento de Klenow. El plásmido pBS-35S-UP1 porta los ADNc de PhCHI1 y PhF3H1 en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

(6) Construcción de pBS-35S-Cya1

Se cortó p35GerANS con AscI, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con SphI para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión SphI de p35GerDFR para la construcción de pBS-35S-Cya1, después se cortó p35GerDFR con XbaI y se volvió romo con el fragmento de Klenow. El plásmido pBS-35S-Cya1 porta los ADNc de GerANS y GerDFR en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

(7) Construcción de pBS-35S-Cya2

Se cortó p35GerF3'H con Ascl, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con SphI para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión SphI de pBS-35S-Cya1 para la construcción de pBS-35S-Cya2, después se cortó pBS-35S-Cya1 con XbaI y se volvió romo con el fragmento de Klenow. El plásmido pBS-35S-Cya2 porta los ADNc de GerF3'H, GerANS y GerDFR en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

(8) Construcción de pBS-35S-Cya3

Se cortó pBS-35S-Cya2 con Ascl, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con SphI para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión SphI de pBS-35S-UP1 para la construcción de pBS-35S-Cya3, después se cortó pBS-35S-UP1 con XbaI y se volvió romo con el fragmento de Klenow. El plásmido pBS-35S-Cya3 porta los ADNc de GerF3'H, GerANS, GerDFR, PhCHL y PhF3H en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

(9) Construcción de pBS-35S-Cya4

Se cortó pBS-35S-Cya3 con Ascl, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con SphI para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión SphI de pBS-35S-mPhCHS3 para la construcción de pBS-35S-Cya4, después se cortó pBS-35S-mPhCHS3 con XbaI y se volvió romo con el fragmento de Klenow. El plásmido pBS-35S-Cya4 porta los ADNc de GerF3'H, GerANS, GerDFR, PhCHL, PhF3H y mPhCHS3 en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

(10) Construcción de pBS-35S-Cya10

Se cortó pBS-35S-mPhF3'H con Ascl, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con SphI para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión SphI de pBS-35S-FT para la construcción de pBS-35S-Cya10, después se cortó pBS-35S-FT con XbaI y se volvió romo con el fragmento de Klenow. El plásmido pBS-35S-Cya10 porta los ADNc de mPhF3'H y FT en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

(11) Construcción de pBS-35S-Del16

Se cortó p35 TorDFR con Ascl, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con SphI para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión SphI de p35PhANS1 para la construcción de pBS-35S-Del16, después se cortó p35PhANS1 con XbaI y se volvió romo con el fragmento de Klenow. El plásmido pBS-35S-Del16 porta los ADNc de TorDFR y PhANS1 en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

(12) Construcción de pBS-35S-UP4

Se cortó pBS-35S-Del16 con Ascl, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con SphI para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión SphI de pBS-35S-UP1 para la construcción de pBS-35S-UP4, después se cortó pBS-35S-UP1 con XbaI y se volvió romo con el fragmento de Klenow. El plásmido pBS-35S-UP4 porta los ADNc de TorDFR, PhANS1, PhCHI1 y PhF3H1 en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

(13) Construcción de pBS-35S-Cya11

Se cortó pBS-35S-mPhF3'H con Ascl, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con SphI para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión SphI de pBS-35S-UP4 para la construcción de pBS-35S-Cya11, después se cortó pBS-35S-UP4 con XbaI y se volvió romo con el fragmento de Klenow. El plásmido pBS-35S-Cya11 porta los ADNc de mPhF3'H, TorDFR, PhANS, PhCHL y PhF3H en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

(14) Construcción de pBS-35S-Cya12

Se cortó pBS-35S-Cya10 con Ascl, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con SphI para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó en el sitio de escisión SphI de pBS-35S-UP4 para la construcción de pBS-35S-Cya12, después se cortó pBS-35S-UP4 con XbaI y se volvió romo con el fragmento de Klenow. El plásmido pBS-35S-Cya12 porta los ADNc de mPhF3'H, FT,

TorDFR, PHANS, PhCHI y PhF3H en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

5 (15) Construcción de pBIH-35S-Cya3

Se cortó pBS-35S-Cya3 con SphI, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con Ascl para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó entre los sitios de escisión Ascl y Swal de pBI-SAS1 para construir pBIH-35S-Cya3. pBIH-35S-Cya3 es un vector binario con una región de ADN-T que porta un marcador seleccionable HPT y los ADNc de GerF3'H, GerANS, GerDFR, PhCHL y PhF3H en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

15 (16) Construcción de pBIH-35S-Cya4

Se cortó pBS-35S-Cya4 con SphI, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con Ascl para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó entre los sitios de escisión Ascl y Swal de pBI-SAS1 para construir pBIH-35S-Cya4. pBIH-35S-Cya4 es un vector binario con una región de ADN-T que porta un marcador seleccionable HPT y los ADNc de GerF3'H, GerANS, GerDFR, PhCHL, PhF3H y mPhCHS3 en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

20 (17) Construcción de pBIH-35S-Cya11

Se cortó pBS-35S-Cya11 con SphI, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con Ascl para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó entre los sitios de escisión Ascl y Swal de pBI-SAS1 para construir pBIH-35S-Cya11. pBIH-35S-Cya11 es un vector binario con una región de ADN-T que lleva un marcador seleccionable HPT y los ADNc de mPhF3'H, TorDFR, PhANS, PhCHI y PhF3H en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

25 (18) Construcción de pBIH-35S-Cya12

Se cortó pBS-35S-Cya12 con SphI, después se volvió romo con el fragmento de Klenow y se cortó adicionalmente con Ascl para separar mediante corte un fragmento de ADN del plásmido. El fragmento de ADN se insertó entre los sitios de escisión Ascl y Swal de pBI-SAS1 para construir pBIH-35S-Cya12. pBIH-35S-Cya12 es un vector binario con una región de ADN-T que lleva un marcador seleccionable HPT y los ADNc de mPhF3'H, FT, TorDFR, PhANS, PhCHI y PhF3H en este orden bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador 35S de CaMV.

30 Ejemplo 13: Producción de la orquídea polilla transformada

Se transfeció una orquídea polilla con los ADN vectores binarios construidos en el Ejemplo 12 (pBIH-35S-Cya3, pBIH-35S-Cya4, pBIH-35S-Cya11 y pBIH-35S-Cya12) y la cepa EHA101 de Agrobacterium, y se seleccionaron las orquídeas polilla transgénicas en presencia de 50 mg/ml de higromicina para obtener orquídeas polilla que tienen los genes citados en el Ejemplo 12 integrado en los cromosomas.

Las orquídeas polilla transgénicas resultantes pueden propagarse clonalmente través de la inducción de PLB de una parte de la planta, tal como las yemas axilares de los tallos de las flores. Las orquídeas polilla transgénicas se pueden usar como parentales en los cruzamientos para obtener una progenie que tenga los genes introducidos.

De este modo, es posible producir una nueva variedad con un color de pétalo rojo a partir de una orquídea polilla blanca mediante cotransfección con los genes F3H, F3'H, DFR y ANS.

35 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención hace posible producir una nueva variedad de orquídea polilla que tiene un color de flor rosa o rojo a partir de una orquídea polilla blanca cambiando el color de la flor a la vez que se mantiene la superioridad de otros caracteres distintos del color de la flor y es aplicable industrialmente a una amplia variedad de usos.

Se hace referencia a la Solicitud de Patente Japonesa Núm. 2007-116396 presentada el 26 de Abril de 2007, incluyendo la memoria descriptiva, las reivindicaciones, los dibujos y el resumen.

40 **Texto libre de la lista de secuencias**

60 SEQ ID NO: 1, Secuencia de nucleótidos que codifica la flavonoide 3'-hidroxilasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis

SEQ ID NO: 2, Secuencia de aminoácidos de la flavonoide 3'-hidroxilasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis

SEQ ID NO: 3, Secuencia de nucleótidos que codifica la flavonoide 3'-hidroxilasa del cultivar híbrido de Gerbera

ES 2 412 704 T3

- SEQ ID NO: 4, Secuencia de aminoácidos de la flavonoide 3'-hidroxilasa del cultivar híbrido de Gerbera
SEQ ID NO: 5, Secuencia de nucleótidos que codifica dihidroflavonol 4-reductasa de Torenia fournieri
SEQ ID NO: 6, Secuencia de aminoácidos de dihidroflavonol 4-reductasa de Torenia fournieri
5 SEQ ID NO: 7, Secuencia de nucleótidos que codifica dihidroflavonol 4-reductasa del cultivar híbrido de Gerbera
SEQ ID NO: 8, Secuencia de aminoácidos de dihidroflavonol 4-reductasa del cultivar híbrido de Gerbera
SEQ ID NO: 9, Secuencia de nucleótidos que codifica la flavonona 3-hidroxilasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis
SEQ ID NO: 10, Secuencia de aminoácidos de la flavonona 3-hidroxilasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis
10 SEQ ID NO: 11, Secuencia de nucleótidos que codifica la antocianidina sintasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis
SEQ ID NO: 12, Secuencia de aminoácidos de la antocianidina sintasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis
SEQ ID NO: 13, Secuencia de nucleótidos que codifica la antocianidina sintasa del cultivar híbrido de Gerbera
SEQ ID NO: 14, Secuencia de aminoácidos de la antocianidina sintasa del cultivar híbrido de Gerbera
15 SEQ ID NO: 15, Secuencia de nucleótidos que codifica la dihidroflavonol 4-reductasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis
SEQ ID NO: 16, Secuencia de aminoácidos de la dihidroflavonol 4-reductasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis
SEQ ID NO: 17, Oligonucleótido SAS-S
SEQ ID NO: 18, Oligonucleótido SAS-AS
20 SEQ ID NO: 19, Cebador T-CaMV35S-Ssel-F
SEQ ID NO: 20, Cebador T-CaMV35S-Ascl-R
SEQ ID NO: 21, Cebador PhCHS3 F1
SEQ ID NO: 22, Cebador PhCHS3 R1
SEQ ID NO: 23, Secuencia de nucleótidos que codifica la chalcona sintasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis
25 SEQ ID NO: 24, Secuencia de aminoácidos de la chalcona sintasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis
SEQ ID NO: 25, Cebador CHL-dgF1
SEQ ID NO: 26, Cebador CHL-dgR1
SEQ ID NO: 27, Cebador CHL-dgF3
SEQ ID NO: 28, Cebador CHL-dgR3
30 SEQ ID NO: 29, Cebador PhCHL-GSP F1
SEQ ID NO: 30, Cebador PhCHL-GSP F2
SEQ ID NO: 31, Cebador PhCHL-GSP R1
SEQ ID NO: 32, Cebador PhCHL-GSP R2
SEQ ID NO: 33, Cebador PhCHL inic
35 SEQ ID NO: 34, Cebador PhCHL term
SEQ ID NO: 35, Secuencia de nucleótidos que codifica la chalcona isomerasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis
SEQ ID NO: 36, Secuencia de aminoácidos de la chalcona isomerasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis
SEQ ID NO: 37, Cebador F3H-dgF1
40 SEQ ID NO: 38, Cebador F3H-dgR1
SEQ ID NO: 39, Cebador F3H-dgF3
SEQ ID NO: 40, Cebador F3H-dgR3
SEQ ID NO: 41, Cebador PhF3H-GSPF1
SEQ ID NO: 42, Cebador PhF3H-GSPF2
45 SEQ ID NO: 43, Cebador PhF3H-GSPR1
SEQ ID NO: 44, Cebador PhF3H-GSPR2
SEQ ID NO: 45, Cebador PhF3H inic.
SEQ ID NO: 46, Cebador PhF3H term.
SEQ ID NO: 47, Cebador F3HDF3
50 SEQ ID NO: 48, Cebador F3HD-R4-2
SEQ ID NO: 49, Cebador F3HDF4
SEQ ID NO: 50, Cebador F3HD-R3-2
SEQ ID NO: 51, Cebador F3HDF5
SEQ ID NO: 52, Cebador F3HD-R1-3
55 SEQ ID NO: 53, Cebador PhF3dH-F7
SEQ ID NO: 54, Cebador PhF3dH-F8
SEQ ID NO: 55, Cebador PhF3dH-R6
SEQ ID NO: 56, Cebador PhF3dH-R5
SEQ ID NO: 57, Cebador PhF3dH-F11 E4
60 SEQ ID NO: 58, Cebador PhF3dH-R7G11
SEQ ID NO: 59, Cebador DFRD-F1
SEQ ID NO: 60, Cebador DFRD-R1
SEQ ID NO: 61, Cebador DFRD-F2
SEQ ID NO: 62, Cebador DFRD-R2

- 5 SEQ ID NO: 63, Cebador DFRD-F3
 SEQ ID NO: 64, Cebador DFRD-R3
 SEQ ID NO: 65, Cebador PhDFR-F1
 SEQ ID NO: 66, Cebador PhDFR-F2
 SEQ ID NO: 67, Cebador PhDFR-R4
 SEQ ID NO: 68, Cebador PhDFR-R3
 SEQ ID NO: 69, Cebador PhDFR-F8A5
 SEQ ID NO: 70, Cebador PhDFR-R5
 SEQ ID NO: 71, Cebador ANS-dgF2
 10 SEQ ID NO: 72, Cebador ANS-dgR2
 SEQ ID NO: 73, Cebador PhANS3RACEGSP1
 SEQ ID NO: 74, Cebador PhANS3RACEGSP2
 SEQ ID NO: 75, Cebador PhANS5RACEGSP1
 SEQ ID NO: 76, Cebador PhANS5RACEGSP2
 15 SEQ ID NO: 77, Cebador PhANS inic
 SEQ ID NO: 78, Cebador PhANS term
 SEQ ID NO: 79, Cebador GerF3H-F
 SEQ ID NO: 80, Cebador GerF3H-R
 SEQ ID NO: 81, Cebador GerDFR-F
 20 SEQ ID NO: 82, Cebador GerDFR-R
 SEQ ID NO: 83, Cebador GerANS-F
 SEQ ID NO: 84, Cebador GerANS-R
 SEQ ID NO: 85, Cebador TorF3H1-F
 SEQ ID NO: 86, Cebador TorF3H1-R
 25 SEQ ID NO: 87, Secuencia de nucleótidos que codifica la flavonoide 3'-hidroxilasa de *Torenia fournieri*
 SEQ ID NO: 88, Secuencia de aminoácidos de la flavonoide 3'-hidroxilasa de *Torenia fournieri*
 SEQ ID NO: 89, Cebador TorDFR-F
 SEQ ID NO: 90, Cebador TorDFR-R
 SEQ ID NO: 91, Cebador AtFT 2nd-F
 30 SEQ ID NO: 92, Cebador AtFT 2nd-R
 SEQ ID NO: 93, Cebador PhF3dH-367F
 SEQ ID NO: 94, Cebador PhF3dH-394R
 SEQ ID NO: 95, Cebador PhF3dH-R7G12
 SEQ ID NO: 96, Cebador PhCHS3-1038F
 35 SEQ ID NO: 97, Cebador PhCHS3-1073R

Lista de secuencias

- <110> Ishiharasangyo Kaisha LTD
 40 <120> Procedimiento para producir una planta Phalaenopsis con el color modificado
 <130> P2007027
 <160> 97
 <170> Patent In versión 3.1
 <210> 1
 45 <211> 1557
 <212> ADN
 <213> cultivar híbrido de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis* Queen Beer)
 <220>
 <221> CDS
 50 <222> (1)..(1557)
 <223> flavonoide 3'-hidroxilasa del cultivar híbrido de *Doritaenopsis*
 <400> 1

ES 2 412 704 T3

atg	gca	tgc	tta	acc	tac	ctg	ctc	ctc	tcc	acc	act	ttc	ctc	ctc	ctc	48
Met	Ala	Cys	Leu	Thr	Tyr	Leu	Leu	Leu	Ser	Thr	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	
1			5						10					15		
ctc	act	ctg	ctc	ctt	ttc	tcc	ggc	gat	cgc	cgg	agc	cga	ccc	cgc	cgc	96
Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	Gly	Asp	Arg	Arg	Ser	Arg	Pro	Arg	Arg	
			20					25					30			
ttc	ccg	ccg	gga	ccc	aaa	ggc	tgg	cgg	atc	atc	ggg	aat	ctt	ccg	caa	144
Phe	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Trp	Pro	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	Pro	Gln	
		35					40					45				
ctc	ggc	ctc	aaa	ccc	cac	caa	acc	cta	acc	gat	ctt	tcg	aaa	acg	tac	192
Leu	Gly	Leu	Lys	Pro	His	Gln	Thr	Leu	Thr	Asp	Leu	Ser	Lys	Thr	Tyr	
	50					55					60					
ggc	ccg	atc	atc	ggc	ctc	cgt	ttc	ggc	tcc	gtc	gcc	gtc	gtc	gcc	gtc	240
Gly	Pro	Ile	Ile	Gly	Leu	Arg	Phe	Gly	Ser	Val	Ala	Val	Val	Ala	Val	
65					70				75						80	
tcc	tcc	gcc	gcc	gcc	gcc	gcc	caa	ttt	ctc	cga	tct	cac	gac	gct	aat	288
Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	His	Asp	Ala	Asn	
				85				90						95		
ttc	agc	agc	cgg	ccg	ccc	aac	tcc	ggc	gca	gag	cac	atc	gca	tac	aac	336
Phe	Ser	Ser	Arg	Pro	Pro	Asn	Ser	Gly	Ala	Glu	His	Ile	Ala	Tyr	Asn	
			100				105						110			
tac	cag	gat	ctg	gcg	ttc	gcg	ccc	tac	ggt	gcg	cgg	tgg	cgc	atg	ctg	384
Tyr	Gln	Asp	Leu	Ala	Phe	Ala	Pro	Tyr	Gly	Ala	Arg	Trp	Arg	Met	Leu	
		115					120					125				
agg	cgt	cta	tgc	gcc	gtg	cat	ctg	ttt	tcg	ggt	aaa	gta	atg	gag	gat	432
Arg	Arg	Leu	Cys	Ala	Val	His	Leu	Phe	Ser	Gly	Lys	Val	Met	Glu	Asp	
	130					135					140					
ttt	cgg	cac	gtg	cgg	gga	ggg	gag	gtg	gag	aga	ctc	gtg	cgg	ggg	atg	480
Phe	Arg	His	Val	Arg	Gly	Gly	Glu	Val	Glu	Arg	Leu	Val	Arg	Gly	Met	
145					150					155					160	
gcg	gag	aag	ggg	gga	ggc	gcg	gtg	gat	gtg	ggg	gcg	gcg	gtg	aac	gcg	528
Ala	Glu	Lys	Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Asp	Val	Gly	Ala	Ala	Val	Asn	Ala	
				165				170						175		
tgt	gcg	act	gat	gcg	ctg	aca	cgt	gtg	gtg	gtg	ggg	agg	cgt	gtg	ttt	576

ES 2 412 704 T3

Cys	Ala	Thr	Asp 180	Ala	Leu	Thr	Arg	Val 185	Val	Val	Gly	Arg	Arg 190	Val	Phe		
ggt Gly	gat Asp	ggg Gly 195	aag Lys	gag Glu	gag Glu	aag Lys	gaa Glu 200	ggc Gly	gcg Ala	gag Glu	gag Glu	ttt Phe 205	aag Lys	gag Glu	atg Met		624
gtg Val 210	gtg Val	gag Glu	ctt Leu	atg Met	cag Gln	ctc Leu 215	gcc Ala	ggc Gly	gtt Val	ttc Phe	aat Asn 220	att Ile	ggg Gly	gat Asp	ttt Phe		672
gtg Val 225	ccc Pro	tgt Cys	ttg Leu	gcc Ala	tgg Trp 230	ctt Leu	gat Asp	tta Leu	cag Gln	ggg Gly 235	gtg Val	gtg Val	agg Arg	aag Lys	atg Met 240		720
aag Lys	aag Lys	ctt Leu	cat His	gga Gly 245	aga Arg	ttt Phe	gat Asp	aaa Lys	ttt Phe 250	ttc Phe	gat Asp	gga Gly	ata Ile	att Ile	gca Ala 255		768
gag Glu	cac His	aga Arg	gag Glu 260	gca Ala	ata Ile	gag Glu	aag Lys	ggc Gly 265	gaa Glu	gtt Val	aat Asn	ggt Gly	gga Gly 270	ggc Gly	agt Ser		816
gat Asp	atg Met	ctg Leu 275	agc Ser	ata Ile	ctc Leu	atc Ile	agg Arg 280	atg Met	aaa Lys	gaa Glu	gaa Glu	ggt Gly 285	gat Asp	ggg Gly	gaa Glu		864
gag Glu 290	ttc Phe	aag Lys	ctt Leu	acc Thr	gat Asp	aca Thr 295	gaa Glu	atc Ile	aag Lys	gct Ala	ctc Leu 300	cta Leu	ctg Leu	aat Asn	cta Leu		912
ttc Phe 305	gca Ala	gca Ala	ggg Gly	acg Thr	gac Asp 310	acc Thr	aca Thr	tca Ser	agc Ser	aca Thr 315	gta Val	gaa Glu	tgg Trp	gcc Ala	tta Leu 320		960
gcc Ala	gag Glu	cta Leu	ata Ile	aga Arg 325	cac His	cca Pro	aag Lys	atc Ile	cta Leu 330	aaa Lys	cga Arg	gcc Ala	caa Gln	aac Asn 335	gag Glu		1008
ctt Leu	gac Asp	tcg Ser	gtc Val 340	atc Ile	gga Gly	ctc Leu	aac Asn	cga Arg 345	ctc Leu	gcc Ala	acc Thr	gag Glu	tcg Ser 350	gac Asp	ctc Leu		1056
ccc Pro	cac His	ctc Leu 355	ccc Pro	tat Tyr	ctc Leu	caa Gln 360	tcc Ser	att Ile	gtc Val	aaa Lys	gaa Glu	acc Thr 365	ttc Phe	cgt Arg	ctc Leu		1104
cat His 370	ccc Pro	tca Ser	acc Thr	cct Pro	ctc Leu	tct Ser 375	ctt Leu	cca Pro	cgt Arg	gtc Val	gct Ala 380	tcc Ser	aac Asn	gac Asp	tgc Cys		1152
cag Gln 385	atc Ile	gat Asp	aac Asn	tac Tyr	ctc Leu 390	att Ile	ccg Pro	aag Lys	ggc Gly	tcc Ser 395	act Thr	ctt Leu	ctc Leu	gtc Val	aat Asn 400		1200
att Ile	tgg Trp	gcc Ala	att Ile	gga Gly 405	cgg Arg	gag Glu	gaa Glu	tca Ser	acg Thr 410	tgg Trp	gca Ala	gat Asp	ggg Gly	ccg Pro	tig Leu		1248
gag Glu	ttc Phe	aag Lys	ccc Pro 420	gag Glu	agg Arg	ttt Phe	ctc Leu 425	ccc Pro	ggc Gly	ggg Gly	ctt Leu	cat His	gag Glu 430	gga Gly	gtt Val		1296
gat Asp	gtt Val	aag Lys 435	ggg Gly	aat Asn	gat Asp	ttt Phe 440	ggg Gly 440	ctc Leu	ata Ile	ccg Pro	ttt Phe	ggg Gly 445	gct Ala	ggg Gly	cgg Arg		1344
agg Arg	att Ile	tgt Cys	gtg Val	ggc Gly	ttg Leu	agt Ser	ttg Leu	ggg Gly	ctg Leu	aga Arg	atg Met	gtg Val	cag Gln	ttc Phe	atg Met		1392

ES 2 412 704 T3

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

ES 2 412 704 T3

Arg Ile Cys Val Gly Leu Ser Leu Gly Leu Arg Met Val Gln Phe Met
450 455 460

Thr Ala Thr Leu Val His Ala Phe Asp Trp Asp Leu Val Asp Gly Leu
465 470 475 480

Ser Gly Glu Lys Leu Asp Met Glu Glu Ala Tyr Gly Leu Thr Leu Arg
485 490 495

Arg Ala Val Pro Leu Val Ala Arg Pro Thr Thr Arg Leu Ala Leu Ser
500 505 510

Ala Tyr His Asn Asp Ala
515

<210> 3

<211> 1539

<212> ADN

5 <213> Cultivar híbrido de Gerbera

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1539)

<223> flavonoide 3'-hidroxilasa del cultivar híbrido de Gerbera

10 <400> 3

atg acg cct tta acg ctg ctt atc ggc acc tgt gtc act gga tta ttc 48
Met Thr Pro Leu Thr Leu Ile Gly Thr Cys Val Thr Gly Leu Phe
1 5 10 15

ctc tac gtg ttg ctt aac cgg tgc acc cgt aac cct aac cgc ctg ccg 96
Leu Tyr Val Leu Asn Arg Cys Thr Arg Asn Pro Asn Arg Leu Pro
20 25 30

ccc ggc cca acg cca tgg ccg gtc gtc gga aac cta ccg cat ctg ggc 144
Pro Gly Pro Thr Pro Trp Pro Val Val Gly Asn Leu Pro His Leu Gly
35 40 45

act ata cca cac cac tgg ctg gcg gcg atg gcg aag aag tat ggc ccg 192
Thr Ile Pro His His Ser Leu Ala Ala Met Ala Lys Lys Tyr Gly Pro
50 55 60

ttg atg cac ctg cgg cta ggc ttc gtc gac gtc gtg gtg gcc gcc tcc 240
Leu Met His Leu Arg Leu Gly Phe Val Asp Val Val Val Ala Ala Ser
65 70 75 80

gcc tcc gtc gcg gcg cag ttt ttg aag act cac gac gcg aac ttc gcc 288
Ala Ser Val Ala Ala Gln Phe Leu Lys Thr His Asp Ala Asn Phe Ala
85 90 95

gat cgg ccg ccg aac tcc gga gcc aag cat atc gcg tat aat tat cag 336
Asp Arg Pro Pro Asn Ser Gly Ala Lys His Ile Ala Tyr Asn Tyr Gln
100 105 110

gat ctg gtg ttt gct ccg tac ggt ccg cgg tgg cgg atg ctt cgg aag 384
Asp Leu Val Phe Ala Pro Tyr Gly Pro Arg Trp Arg Met Leu Arg Lys
115 120 125

att tgc tgg gtg cac ctg ttt tcc acc aaa gcg ctg gat gat ttc ccg 432
Ile Cys Ser Val His Leu Phe Ser Thr Lys Ala Leu Asp Asp Phe Arg
130 135 140

cac gtc ccg cag gag gag gta gcg ata cta gcg cgc gct ttg gtc ggc 480

ES 2 412 704 T3

H i s	V a l	A r g	G n	G u	G u	V a l	A l a	I l e	L e u	A l a	A r g	A l a	L e u	V a l	G y		
145					150					155					160		
g c c	g g a	a a a	t c a	c c g	g t g	a a a	t t a	g g t	c a g	t t a	c t g	a a c	g t g	t g c	a c c		528
A l a	G y	L y s	S e r	P r o	V a l	L y s	L e u	G y	G n	L e u	L e u	A s n	V a l	C y s	T h r		
				165					170					175			
a c a	a a c	g c a	t t g	g c g	c g a	g t g	a t g	t t a	g g g	a g g	a g a	g t a	t t t	g a c	t c c		576
T h r	A s n	A l a	L e u	A l a	A r g	V a l	M e t	L e u	G y	A r g	A r g	V a l	P h e	A s p	S e r		
			180					185					190				
g g c	g a t	g c t	c a g	g c g	g a t	g a g	t t c	a a g	g a c	a t g	g t g	g t t	g a g	c t g	a t g		624
G y	A s p	A l a	G n	A l a	A s p	G u	P h e	L y s	A s p	M e t	V a l	V a l	G u	L e u	M e t		
		195					200					205					
g t g	t t a	g c c	g g a	g a a	t t c	a a c	a t c	g g c	g a c	t t c	a t c	c c c	g t g	c t t	g a c		672
V a l	L e u	A l a	G y	G u	P h e	A s n	I l e	G y	A s p	P h e	I l e	P r o	V a l	L e u	A s p		
	210					215					220						
t g g	c t g	g a c	c t g	c a a	g g c	g t g	a c g	a a g	a a g	a t g	a a g	a a a	c t c	c a c	g c g		720
T r p	L e u	A s p	L e u	G n	G y	V a l	T h r	L y s	L y s	M e t	L y s	L y s	L e u	H i s	A l a		
225				230						235					240		
a a a	t t c	g a c	t c g	t t c	c t t	a a c	a c g	a t c	c t c	g a a	g a a	c a t	a a a	a c c	g g c		768
L y s	P h e	A s p	S e r	P h e	L e u	A s n	T h r	I l e	L e u	G u	G u	H i s	L y s	T h r	G y		
				245					250					255			
g c c	g g t	g a c	g g t	g t c	g c g	t c g	g g t	a a a	g t t	g a c	t t g	t t g	a g c	a c g	t t g		816
A l a	G y	A s p	A l a	V a l	A l a	S e r	G y	L y s	V a l	A s p	L e u	L e u	S e r	T h r	L e u		
			260					265					270				
c t t	t c c	c t g	a a g	g a t	g a c	g c c	g a t	g g a	g a g	g g a	g g g	a a g	c t g	t c g	g a c		864
L e u	S e r	L e u	L y s	A s p	A s p	A l a	A s p	G y	G u	G y	G y	L y s	L e u	S e r	A s p		
		275				280						285					
a t t	g a a	a t c	a a a	g c t	t t g	c t t	c t g	a a c	t t a	t t c	a c a	g c g	g g g	a c t	g a c		912
I l e	G u	I l e	L y s	A l a	L e u	L e u	L e u	A s n	L e u	P h e	T h r	A l a	G y	T h r	A s p		
	290					295					300						
a c a	t c a	t c t	a g t	a c t	g t t	g a a	t g g	g c c	a t a	g c t	g a a	c t a	a t t	c g c	a a c		960
T h r	S e r	S e r	S e r	T h r	V a l	G u	T r p	A l a	I l e	A l a	G u	L e u	I l e	A r g	A s n		
					310					315					320		
c c g	c a a	c t a	t t g	a a c	c a a	g c c	c g a	a a a	g a a	a t g	g a c	a c c	a t a	g t t	g g t		1008
P r o	G n	L e u	L e u	A s n	G n	A l a	A r g	L y s	G u	M e t	A s p	T h r	I l e	V a l	G y		
				325					330					335			
c a a	g a c	c g a	c t t	g t a	a c c	g a g	t c a	g a c	c t a	g g t	c a a	c t a	a c a	t t c	c t c		1056
G n	A s p	A r g	L e u	V a l	T h r	G u	S e r	A s p	L e u	G y	G n	L e u	T h r	P h e	L e u		
			340					345					350				
c a a	g c c	a t t	a t c	a a g	g a a	a c t	t t t	a g g	c t t	c a c	c c g	t c a	a c c	c c a	c t a		1104
G n	A l a	I l e	I l e	L y s	G u	T h r	P h e	A r g	L e u	H i s	P r o	S e r	T h r	P r o	L e u		
		355					360					365					
t c a	c t g	c c a	a g g	a t g	g c a	t t g	g a g	a g t	t g t	g a g	g t t	g a c	g g t	t a t	t a c		1152
S e r	L e u	P r o	A r g	M e t	A l a	L e u	G u	S e r	C y s	G u	V a l	A s p	G y	T y r	T y r		
	370					375					380						
a t c	c c t	a a a	g g a	t c c	a c t	c t c	c t t	g t t	a a t	g t g	t g g	g c c	a t t	t c t	c g a		1200
I l e	P r o	L y s	G y	S e r	T h r	L e u	L e u	V a l	A s n	V a l	T r p	A l a	I l e	S e r	A r g		
	385				390					395					400		
g a c	c c t	a a a	a t g	t g g	g c c	g a t	c c a	c t t	g a a	t t t	c a g	c c c	a c t	c g a	t t c		1248
A s p	P r o	L y s	M e t	T r p	A l a	A s p	P r o	L e u	G u	P h e	G n	P r o	T h r	A r g	P h e		
			405						410					415			
t t a	c c c	g g g	g g t	g a a	a a g	g c c	a a t	a c t	g a t	a t c	a a a	g g a	a a t	g a t	t t t		1296
L e u	P r o	G y	G y	G u	L y s	A l a	A s n	T h r	A s p	I l e	L y s	G y	A s n	A s p	P h e		

ES 2 412 704 T3

Gl u Val Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Val Gly Met Ser
435 440 445

Leu Gly Leu Arg Met Val Gln Leu Leu Thr Ala Thr Leu Ile His Ala
450 455 460

Phe Asp Trp Gl u Leu Ala Asp Gly Leu Asn Pro Lys Lys Leu Asn Met
465 470 475 480

Gl u Gl u Ala Tyr Gly Leu Thr Leu Gln Arg Ala Ala Pro Leu Val Val
485 490 495

His Pro Arg Pro Arg Leu Ala Pro His Val Tyr Gl u Thr Thr Lys Val
500 505 510

<210> 5

<211> 1050

<212> ADN

5 <213> Torenia fournieri

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1050)

<223> Dihydroflavonol 4-reductasa de Torenia fournieri

10 <400> 5

at g agc at g gaa gt a gt a gt a cca aaa gca cag ccc at c aca gt g t gt 48
Met Ser Met Gl u Val Val Val Pro Lys Ala Gln Pro Ile Thr Val Cys
1 5 10 15

gt c acc gga gcc agc ggt t t c at a ggc t ca t gg ct t gt a at g aaa ct a 96
Val Thr Gly Ala Ser Gly Phe Ile Gly Ser Trp Leu Val Met Lys Leu
20 25 30

ct t caa cgt ggt t at aca gt t cat gcc act gt c cgt gat cct gag aat 144
Leu Gln Arg Gly Tyr Thr Val His Ala Thr Val Arg Asp Pro Gl u Asn
35 40 45

at g aag aag gt g aaa cac t t a ct g gaa t t g cca aga gct gac gat gcg 192
Met Lys Lys Val Lys His Leu Leu Gl u Leu Pro Arg Ala Asp Asp Ala
50 55 60

agc ct g aga ct g t t c aaa gct gat at g aac gt a gaa ggt agc t t c gat 240
Ser Leu Arg Leu Phe Lys Ala Asp Met Asn Val Gl u Gly Ser Phe Asp
65 70 75 80

gaa gca gt t gga t cc tgc gaa tgt gt g t t t cac at g gca acg cct at g 288
Gl u Ala Val Gly Ser Cys Gl u Cys Val Phe His Met Ala Thr Pro Met
85 90 95

gat t t c gaa t cg gac gat cct gag aat gaa gt g att aag cca aca gt a 336
Asp Phe Gl u Ser Asp Asp Pro Gl u Asn Gl u Val Ile Lys Pro Thr Val
100 105 110

gat ggg at g t t g agc at c at c agg t ca t gt gca aag gcc caa aca gt c 384
Asp Gly Met Leu Ser Ile Ile Arg Ser Cys Ala Lys Ala Gln Thr Val
115 120 125

aag aga t t g at c t t c acc aac t cg gct ggg act t t g aat gt c gaa gaa 432
Lys Arg Leu Ile Phe Thr Asn Ser Ala Gly Thr Leu Asn Val Gl u Gl u
130 135 140

ES 2 412 704 T3

cac cag aaa cct gtg tat gat gag agc aat tgg agt gac ctg gat ttt 480
 His Gln Lys Pro Val Tyr Asp Glu Ser Asn Trp Ser Asp Leu Asp Phe
 145 150 155 160
 att tac tcc acg aaa atg acg gga tgg atg tac ttt gta tct aag gtt 528
 Ile Tyr Ser Thr Lys Met Thr Gly Trp Met Tyr Phe Val Ser Lys Val
 165 170 175
 ttg gcc gag aaa gca gcg att aaa gca tgt aag gag aat aac ata gat 576
 Leu Ala Glu Lys Ala Ala Ile Lys Ala Oys Lys Glu Asn Asn Ile Asp
 180 185 190
 ttc ata agc atc ata cct cca gta gtg gtc ggt ccg ttc atc atc gat 624
 Phe Ile Ser Ile Ile Pro Pro Val Val Gly Pro Phe Ile Ile Asp
 195 200 205
 aat tgg cca ccg agc ctg atc aca gca ctg tct cct att acc ggc aat 672
 Asn Trp Pro Pro Ser Leu Ile Thr Ala Leu Ser Pro Ile Thr Gly Asn
 210 215 220
 gaa gct cat tac tcc atc ata aag caa gga cag ttt gtg cat gtt gat 720
 Glu Ala His Tyr Ser Ile Ile Lys Gln Gly Gln Phe Val His Val Asp
 225 230 235 240
 gat ctg tgt gag gct cat ata ttc ttg tct gag cat ccc aaa aca gaa 768
 Asp Leu Oys Glu Ala His Ile Phe Leu Ser Glu His Pro Lys Thr Glu
 245 250 255
 gag aga tac att tgc tcc tct cat gac gca acc att tac gac ata gcg 816
 Glu Arg Tyr Ile Oys Ser Ser His Asp Ala Thr Ile Tyr Asp Ile Ala
 260 265 270
 aat atg atc aga gag aaa tgg cct gaa tat gat gtc cca act gaa ttt 864
 Asn Met Ile Arg Glu Lys Trp Pro Glu Tyr Asp Val Pro Thr Glu Phe
 275 280 285
 gag gga att gac aag gac ata cct gtg gtg aga ttt tca tcc aag aaa 912
 Glu Gly Ile Asp Lys Asp Ile Pro Val Val Arg Phe Ser Ser Lys Lys
 290 295 300
 ctg atg gga atg gga ttt acc ttc aag tat aca ttg gag gac atg ttc 960
 Leu Met Gly Met Gly Phe Thr Phe Lys Tyr Thr Leu Glu Asp Met Phe
 305 310 315 320
 aga gaa gcc att gag act tgt cga gac aaa ggg ctt ctt cct tat tcg 1008
 Arg Glu Ala Ile Glu Thr Oys Arg Asp Lys Gly Leu Leu Pro Tyr Ser
 325 330 335
 acc act cgc gac cac atc cat gga gaa cat aag ata gaa tag 1050
 Thr Thr Arg Asp His Ile His Gly Glu His Lys Ile Glu
 340 345

<210> 6

<211> 349

<212> PRT

5 <213> Toreniaournieri

<400> 6

Met Ser Met Glu Val Val Val Pro Lys Ala Gln Pro Ile Thr Val Oys
 1 5 10 15

Val Thr Gly Ala Ser Gly Phe Ile Gly Ser Trp Leu Val Met Lys Leu
 20 25 30

ES 2 412 704 T3

Leu G n Arg G y Tyr Thr Val Hi s Ala Thr Val Arg Asp Pro G u Asn
 35 40 45
 Met Lys Lys Val Lys Hi s Leu Leu G u Leu Pro Arg Ala Asp Asp Ala
 50 55 60
 Ser Leu Arg Leu Phe Lys Ala Asp Met Asn Val G u G y Ser Phe Asp
 65 70 75 80
 G u Ala Val G y Ser Cys G u Cys Val Phe Hi s Met Ala Thr Pro Met
 85 90 95
 Asp Phe G u Ser Asp Asp Pro G u Asn G u Val Ile Lys Pro Thr Val
 100 105 110
 Asp G y Met Leu Ser Ile Ile Arg Ser Cys Ala Lys Ala G n Thr Val
 115 120 125
 Lys Arg Leu Ile Phe Thr Asn Ser Ala G y Thr Leu Asn Val G u G u
 130 135 140
 Hi s G n Lys Pro Val Tyr Asp G u Ser Asn Trp Ser Asp Leu Asp Phe
 145 150 155 160
 Ile Tyr Ser Thr Lys Met Thr G y Trp Met Tyr Phe Val Ser Lys Val
 165 170 175
 Leu Ala G u Lys Ala Ala Ile Lys Ala Cys Lys G u Asn Asn Ile Asp
 180 185 190
 Phe Ile Ser Ile Ile Pro Pro Val Val Val G y Pro Phe Ile Ile Asp
 195 200 205
 Asn Trp Pro Pro Ser Leu Ile Thr Ala Leu Ser Pro Ile Thr G y Asn
 210 215 220
 G u Ala Hi s Tyr Ser Ile Ile Lys G n G y G n Phe Val Hi s Val Asp
 225 230 235 240
 Asp Leu Cys G u Ala Hi s Ile Phe Leu Ser G u Hi s Pro Lys Thr G u
 245 250 255
 G u Arg Tyr Ile Cys Ser Ser Hi s Asp Ala Thr Ile Tyr Asp Ile Ala
 260 265 270
 Asn Met Ile Arg G u Lys Trp Pro G u Tyr Asp Val Pro Thr G u Phe
 275 280 285
 G u G y Ile Asp Lys Asp Ile Pro Val Val Arg Phe Ser Ser Lys Lys
 290 295 300
 Leu Met G y Met G y Phe Thr Phe Lys Tyr Thr Leu G u Asp Met Phe
 305 310 315 320
 Arg G u Ala Ile G u Thr Cys Arg Asp Lys G y Leu Leu Pro Tyr Ser
 325 330 335
 Thr Thr Arg Asp Hi s Ile Hi s G y G u Hi s Lys Ile G u
 340 345
 <210> 7

ES 2 412 704 T3

<211> 1101
 <212> ADN
 <213> cultivar híbrido de Gerbera
 <220>

5 <221> CDS
 <222> (1)..(1101)
 <223> Dihidroflavonol 4-reductasa del cultivar híbrido de Gerbera
 <400> 7

at g	gaa	gag	gat	t ct	ccg	gcc	acc	gt t	t gt	gt c	acc	gga	gcg	gcc	ggg	48
Met	Gu	Gu	Asp	Ser	Pro	Ala	Thr	Val	Cys	Val	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	
1			5					10					15			
t tc	at c	ggc	t ca	t gg	ct c	gt c	at g	aga	ct t	ct t	gaa	cgt	gga	t ac	gt t	96
Phe	Ile	Gly	Ser	Trp	Leu	Val	Met	Arg	Leu	Leu	Gu	Arg	Gly	Tyr	Val	
		20					25					30				
gt t	cat	gca	act	gt t	cgt	gat	ccc	ggt	gac	t tg	aag	aag	gt g	aag	cat	144
Val	His	Ala	Thr	Val	Arg	Asp	Pro	Gly	Asp	Leu	Lys	Val	Lys	Lys	His	
		35				40					45					
t tg	ct a	gaa	ct a	cca	aaa	gca	caa	aca	aac	t tg	aaa	t ta	t gg	aaa	gca	192
Leu	Leu	Gu	Leu	Pro	Lys	Ala	Gln	Thr	Asn	Leu	Lys	Leu	Trp	Lys	Ala	
	50					55					60					
gat	t tg	aca	caa	gaa	gga	agc	t tt	gat	gaa	gcc	att	caa	ggt	t gc	cat	240
Asp	Leu	Thr	Gln	Gu	Gly	Ser	Phe	Asp	Gu	Ala	Ile	Gln	Gly	Cys	His	
65				70						75					80	
ggt	gt c	t tc	cat	ct g	gcc	act	cct	at g	gac	t tt	gag	t cc	aag	gac	cct	288
Gly	Val	Phe	His	Leu	Ala	Thr	Pro	Met	Asp	Phe	Gu	Ser	Lys	Asp	Pro	
				85					90					95		
gag	aac	gaa	at t	at a	aag	cca	aca	at c	gaa	ggg	gt a	t ta	agc	at c	at t	336
Gu	Asn	Gu	Ile	Ile	Lys	Pro	Thr	Ile	Gu	Gly	Val	Leu	Ser	Ile	Ile	
			100					105					110			
cga	t ca	t gt	gt c	aaa	gcg	aaa	acc	gt g	aag	aaa	ct a	gt g	t tc	acc	t cc	384
Arg	Ser	Cys	Val	Lys	Ala	Lys	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Val	Phe	Thr	Ser	
		115				120						125				
t cc	gcc	ggg	acc	gt g	aac	gga	caa	gag	aaa	caa	ct g	cac	gt g	t ac	gac	432
Ser	Ala	Gly	Thr	Val	Asn	Gly	Gln	Gu	Lys	Gln	Leu	His	Val	Tyr	Asp	
	130					135					140					
gaa	t ct	cat	t gg	agc	gat	t tg	gat	t tt	at a	t ac	t ct	aaa	aaa	at g	act	480
Gu	Ser	His	Trp	Ser	Asp	Leu	Asp	Phe	Ile	Tyr	Ser	Lys	Lys	Met	Thr	
	145			150					155					160		
gct	t gg	at g	t at	t tc	gt g	t ca	aaa	act	t tg	gct	gaa	aaa	gct	gcg	t gg	528
Ala	Trp	Met	Tyr	Phe	Val	Ser	Lys	Thr	Leu	Ala	Gu	Lys	Ala	Ala	Trp	
				165					170					175		
gat	gca	acg	aaa	gga	aac	aac	at t	agt	t tt	at t	agt	at c	at c	cca	acc	576
Asp	Ala	Thr	Lys	Gly	Asn	Asn	Ile	Ser	Phe	Ile	Ser	Ile	Ile	Pro	Thr	

10

ES 2 412 704 T3

	180		185		190		
	ctg gta gtt ggt ccg ttt atc acc tcg acg ttc cca cca agt ct c gtt						624
	Leu Val Val Gly Pro Phe lle Thr Ser Thr Phe Pro Pro Ser Leu Val						
	195		200		205		
	acc gcg ctt tct ttg atc acg ggc aat gaa gca cat tat tca att ata						672
	Thr Ala Leu Ser Leu lle Thr Gly Asn Gu Ala His Tyr Ser lle lle						
	210		215		220		
	aag caa ggt caa tat gtg cac tta gat gat ctt tgt gag tgt cat ata						720
	Lys Gn Gly Gn Tyr Val His Leu Asp Asp Leu Cys Gu Oys His lle						240
	225		230		235		
	tac cta tat gag aac cct aaa gca aaa gga aga tac att tgt tct tct						768
	Tyr Leu Tyr Gu Asn Pro Lys Ala Lys Gly Arg Tyr lle Cys Ser Ser						255
	245		250				
	cat gat gcc acc att cat caa ttg gct aaa atc atc aaa gac aag tgg						816
	His Asp Ala Thr lle His Gn Leu Ala Lys lle lle Lys Asp Lys Trp						270
	260		265				
	cca gag tac tat att cca acc aag ttt ccg ggg atc gat gag gag cta						864
	Pro Gu Tyr Tyr lle Pro Thr Lys Phe Pro Gly lle Asp Gu Gu Leu						285
	275		280				
	ccg ata gtt tct ttt tcg tca aag aag tta att gac acg ggt ttc gag						912
	Pro lle Val Ser Phe Ser Ser Lys Lys Leu lle Asp Thr Gly Phe Gu						300
	290		295		300		
	ttt aag tat aat tta gag gac atg ttt aaa gga gcc att gat aca tgt						960
	Phe Lys Tyr Asn Leu Gu Asp Met Phe Lys Gly Ala lle Asp Thr Oys						320
	305		310		315		
	aga gaa aag gga ttg ctt cca tat tcc aca atc aag aac cat ata aat						1008
	Arg Gu Lys Gly Leu Leu Pro Tyr Ser Thr lle Lys Asn His lle Asn						335
	325		330				
	ggt aac cat gtt aat ggt gtt cat cat tat ata aaa aac aat gat gat						1056
	Gly Asn His Val Asn Gly Val His His Tyr lle Lys Asn Asn Asp Asp						350
	340		345				
	gat cat gaa aag ggt ttg ctt tgt tgt tca aaa gaa ggc caa tag						1101
	Asp His Gu Lys Gly Leu Leu Cys Oys Ser Lys Gu Gly Gn						365
	355		360				
	<210> 8						
	<211> 366						
	<212> PRT						
5	<213> Cultivar híbrido de Gerbera						
	<400> 8						
	Met Gu Gu Asp Ser Pro Ala Thr Val Cys Val Thr Gly Ala Ala Gly						
	1		5		10		15
	Phe lle Gly Ser Trp Leu Val Met Arg Leu Leu Gu Arg Gly Tyr Val						
	20		25		30		
	Val His Ala Thr Val Arg Asp Pro Gly Asp Leu Lys Lys Val Lys His						
	35		40		45		
	Leu Leu Gu Leu Pro Lys Ala Gn Thr Asn Leu Lys Leu Trp Lys Ala						
	50		55		60		

ES 2 412 704 T3

Asp Leu Thr G n G u G y Ser Phe Asp G u Ala Ile G n G y Cys His
65 70 75 80

G y Val Phe His Leu Ala Thr Pro Met Asp Phe G u Ser Lys Asp Pro
85 90 95

G u Asn G u Ile Ile Lys Pro Thr Ile G u G y Val Leu Ser Ile Ile
100 105 110

Arg Ser Cys Val Lys Ala Lys Thr Val Lys Lys Leu Val Phe Thr Ser
115 120 125

Ser Ala G y Thr Val Asn G y G n G u Lys G n Leu His Val Tyr Asp
130 135 140

G u Ser His Trp Ser Asp Leu Asp Phe Ile Tyr Ser Lys Lys Met Thr
145 150 155 160

Ala Trp Met Tyr Phe Val Ser Lys Thr Leu Ala G u Lys Ala Ala Trp
165 170 175

Asp Ala Thr Lys G y Asn Asn Ile Ser Phe Ile Ser Ile Ile Pro Thr
180 185 190

Leu Val Val G y Pro Phe Ile Thr Ser Thr Phe Pro Pro Ser Leu Val
195 200 205

Thr Ala Leu Ser Leu Ile Thr G y Asn G u Ala His Tyr Ser Ile Ile
210 215 220

Lys G n G y G n Tyr Val His Leu Asp Asp Leu Cys G u Cys His Ile
225 230 235 240

Tyr Leu Tyr G u Asn Pro Lys Ala Lys G y Arg Tyr Ile Cys Ser Ser
245 250 255

His Asp Ala Thr Ile His G n Leu Ala Lys Ile Ile Lys Asp Lys Trp
260 265 270

Pro G u Tyr Tyr Ile Pro Thr Lys Phe Pro G y Ile Asp G u G u Leu
275 280 285

Pro Ile Val Ser Phe Ser Ser Lys Lys Leu Ile Asp Thr G y Phe G u
290 295 300

Phe Lys Tyr Asn Leu G u Asp Met Phe Lys G y Ala Ile Asp Thr Cys
305 310 315 320

Arg G u Lys G y Leu Leu Pro Tyr Ser Thr Ile Lys Asn His Ile Asn
325 330 335

G y Asn His Val Asn G y Val His His Tyr Ile Lys Asn Asn Asp Asp
340 345 350

Asp His G u Lys G y Leu Leu Cys Cys Ser Lys G u G y G n
355 360 365

<210> 9

<211> 1113

<212> ADN

<213> Cultivar híbrido de Doritaenopsis (Doritaenopsis Sogo Vivien x Doritaenopsis Sogo Yenlin)

5

ES 2 412 704 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1113)

<223> flavanona 3-hidroxisilasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis

5

<400> 9

atg gcc cca ata cca ttc cta ccg act gcg gtt aca gag aag aca ctg	48
Met Ala Pro Ile Pro Phe Leu Pro Thr Ala Val Thr Gu Lys Thr Leu	
1 5 10 15	
aga gca agc ttt gta cgg gat gag gac gag agg cca aag gta gcc tac	96
Arg Ala Ser Phe Val Arg Asp Gu Asp Gu Arg Pro Lys Val Ala Tyr	
20 25 30	
aac gaa ttc agt aac cag att ccg gtg atc tca ctt cag ggg atc gaa	144
Asn Gu Phe Ser Asn Gn lle Pro Val lle Ser Leu Gn Gy lle Gu	
35 40 45	
gag aat gga gac gga ggt cga agg tcg gag att tgc cgg agt atc gtg	192
Gu Asn Gy Asp Gy Gy Arg Ser Gu lle Cys Arg Ser lle Val	
50 55 60	
gca gcg tgc gag gac tgg gga atc ttt cag gcc gtc gac cat ggt gtc	240
Ala Ala Cys Gu Asp Trp Gy lle Phe Gn Ala Val Asp His Gy Val	
65 70 75 80	
gat gca ggg ctc atc gca gac atg aac cgc ctt gct cga gag ttc ttc	288
Asp Ala Gy Leu lle Ala Asp Met Asn Arg Leu Ala Arg Gu Phe Phe	
85 90 95	
gat ctg ctg cca gag gag aag ctt cgt ttt gac atg tcc ggc ggg aag	336
Asp Leu Leu Pro Gu Gu Lys Leu Arg Phe Asp Met Ser Gy Gy Lys	
100 105 110	
aaa ggc ggc ttc atc gtt tcc agc cat ctt cag ggt gaa gta gtt caa	384
Lys Gy Gy Phe lle Val Ser Ser His Leu Gn Gy Gu Val Val Gn	
115 120 125	
gat tgg agg gag atc gtt acc tat ttc tca tac cca atc ggg agc cgc	432
Asp Trp Arg Gu lle Val Thr Tyr Phe Ser Tyr Pro lle Gy Ser Arg	
130 135 140	
gat tac tcg cgg tgg ccg gac aag ccg gag ggg tgg cgc gct gtt gtg	480
Asp Tyr Ser Arg Trp Pro Asp Lys Pro Gu Gy Trp Arg Ala Val Val	
145 150 155 160	
gag gag tac agc gcc aag ctg atg gag ctg gcc tgc aat ct c ct c ggc	528
Gu Gu Tyr Ser Ala Lys Leu Met Gu Leu Ala Cys Asn Leu Leu Gy	
165 170 175	
gtg cta tcg gaa gcc atg gga cta gat cgt gaa gcc cta gcc gga gcc	576
Val Leu Ser Gu Ala Met Gy Leu Asp Arg Gu Ala Leu Ala Gy Ala	
180 185 190	

ES 2 412 704 T3

tgt atc gat atg gac cag aaa ttg gtg gtc aat ttc tac cca aaa tgc 624
 Cys Ile Asp Met Asp Gln Lys Leu Val Val Asn Phe Tyr Pro Lys Cys
 195 200 205

ccg caa ccg gac ctg acc ctg ggc ctg aag cgc cac aca gac ccc ggc 672
 Pro Gln Pro Asp Leu Thr Leu Gly Leu Lys Arg His Thr Asp Pro Gly
 210 215 220

acc att acc ctg ttg ctt caa gat caa gtc ggc ggt ctg caa gcc acc 720
 Thr Ile Thr Leu Leu Leu Gln Asp Gln Val Gly Gly Leu Gln Ala Thr
 225 230 235 240

aag gac gac ggt aaa acc tgg atc acc gtt cag cct gtc cag aat gct 768
 Lys Asp Asp Gly Lys Thr Trp Ile Thr Val Gln Pro Val Gln Asn Ala
 245 250 255

ttc gtc gtt aac ctg ggc gac cac ggt cat tac ctg agc aac ggt cgg 816
 Phe Val Val Asn Leu Gly Asp His Gly His Tyr Leu Ser Asn Gly Arg
 260 265 270

ttt aag aac gcg gac cat cag gcc gtc gtg aac tcg aat tac agc cgg 864
 Phe Lys Asn Ala Asp His Gln Ala Val Val Asn Ser Asn Tyr Ser Arg
 275 280 285

ctt tcg atc gcg gcg ttc cag aac cct gct ccg gaa gcg gtt gtt tac 912
 Leu Ser Ile Ala Ala Phe Gln Asn Pro Ala Pro Gu Ala Val Val Tyr
 290 295 300

ccg cta ccg gtg agg gaa gga gag agg ccg gtg atg gag gag gcc atc 960
 Pro Leu Ala Val Arg Gu Gly Gu Arg Pro Val Met Gu Gu Gly Ile
 305 310 315 320

aca ttt gcg gag atg tat agg agg aag atg agc agg gat ctg gag ctg 1008
 Thr Phe Ala Gu Met Tyr Arg Arg Lys Met Ser Arg Asp Leu Gu Leu
 325 330 335

gcc agg ttg aag aag atg gcg aag atg gag agt ggg gag gaa ggg gcc 1056
 Ala Arg Leu Lys Lys Met Ala Lys Met Gu Ser Gly Gu Gu Gly Ala
 340 345 350

gca gga aag act gct gag gtt act gga gca aag gca tta aat gag att 1104
 Ala Gly Lys Thr Ala Gu Val Thr Gly Ala Lys Ala Leu Asn Gu Ile
 355 360

tta gct taa 1113
 Leu Ala
 370
 <210> 10
 <211> 370
 <212> PRT

5 <213> Cultivar híbrido de Doritaenopsis (Doritaenopsis Sogo Vivien x Doritaenopsis Sogo Yenlin)
 <400> 10
 Met Ala Pro Ile Pro Phe Leu Pro Thr Ala Val Thr Gu Lys Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Phe Val Arg Asp Gu Asp Gu Arg Pro Lys Val Ala Tyr
 20 25 30

Asn Gu Phe Ser Asn Gln Ile Pro Val Ile Ser Leu Gln Gly Ile Gu
 35 40 45

ES 2 412 704 T3

Glu Asn Gly Asp Gly Gly Arg Arg Ser Glu Ile Cys Arg Ser Ile Val
 50 55 60
 Ala Ala Cys Glu Asp Trp Gly Ile Phe Gn Ala Val Asp His Gly Val
 65 70 75 80
 Asp Ala Gly Leu Ile Ala Asp Met Asn Arg Leu Ala Arg Glu Phe Phe
 85 90 95
 Asp Leu Leu Pro Glu Glu Lys Leu Arg Phe Asp Met Ser Gly Gly Lys
 100 105 110
 Lys Gly Gly Phe Ile Val Ser Ser His Leu Gn Gly Glu Val Val Gn
 115 120 125
 Asp Trp Arg Glu Ile Val Thr Tyr Phe Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Arg
 130 135 140
 Asp Tyr Ser Arg Trp Pro Asp Lys Pro Glu Gly Trp Arg Ala Val Val
 145 150 155 160
 Glu Glu Tyr Ser Ala Lys Leu Met Glu Leu Ala Cys Asn Leu Leu Gly
 165 170 175
 Val Leu Ser Glu Ala Met Gly Leu Asp Arg Glu Ala Leu Ala Gly Ala
 180 185 190
 Cys Ile Asp Met Asp Gn Lys Leu Val Val Asn Phe Tyr Pro Lys Cys
 195 200 205
 Pro Gn Pro Asp Leu Thr Leu Gly Leu Lys Arg His Thr Asp Pro Gly
 210 215 220
 Thr Ile Thr Leu Leu Leu Gn Asp Gn Val Gly Gly Leu Gn Ala Thr
 225 230 235 240
 Lys Asp Asp Gly Lys Thr Trp Ile Thr Val Gn Pro Val Gn Asn Ala
 245 250 255
 Phe Val Val Asn Leu Gly Asp His Gly His Tyr Leu Ser Asn Gly Arg
 260 265 270
 Phe Lys Asn Ala Asp His Gn Ala Val Val Asn Ser Asn Tyr Ser Arg
 275 280 285
 Leu Ser Ile Ala Ala Phe Gn Asn Pro Ala Pro Glu Ala Val Val Tyr
 290 295 300
 Pro Leu Ala Val Arg Glu Gly Glu Arg Pro Val Met Glu Glu Gly Ile
 305 310 315 320
 Thr Phe Ala Glu Met Tyr Arg Arg Lys Met Ser Arg Asp Leu Glu Leu

ES 2 412 704 T3

				165					170					175		
	gag	ctc	cga	acc	cta	gcc	tca	aaa	atg	ttc	tcc	ata	ctc	tcc	ctc	ggt
	Gu	Leu	Arg	Thr	Leu	Ala	Ser	Lys	Met	Phe	Ser	Ile	Leu	Ser	Leu	Gly
				180					185					190		
	ctc	ggc	ctc	gac	caa	aac	aag	ctc	gaa	gct	gag	ctc	ggc	ggc	caa	gac
	Leu	Gly	Leu	Asp	Gln	Asn	Lys	Leu	Gu	Ala	Gu	Leu	Gly	Gly	Gln	Asp
			195					200					205			
	gac	ctc	ctc	ctc	cag	ctt	aag	atc	aat	tac	tac	ccg	ccc	tgc	ccg	cag
	Asp	Leu	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Pro	Pro	Oys	Pro	Gln
		210					215					220				
	ccg	gag	ctg	gcc	ctc	ggc	gtc	gag	gcc	cac	acc	gac	gtc	agc	tcc	ctc
	Pro	Gu	Leu	Ala	Leu	Gly	Val	Gu	Ala	His	Thr	Asp	Val	Ser	Ser	Leu
		225				230					235					240
	tcc	ttc	atc	ctt	cac	aac	ggg	atc	ccc	ggc	ctc	cag	gtc	ttc	aag	aac
	Ser	Phe	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ile	Pro	Gly	Leu	Gln	Val	Phe	Lys	Asn
					245					250					255	
	ggc	gcc	ggc	tgg	atc	acc	gct	ccc	ctc	gtc	cca	aac	tgc	atc	atc	gtt
	Gly	Ala	Gly	Trp	Ile	Thr	Ala	Pro	Leu	Val	Pro	Asn	Ser	Ile	Ile	Val
				260					265					270		
	cac	gtc	ggg	gat	gcg	ctc	gag	atc	ctc	agc	aat	ggg	agg	tgc	cac	agc
	His	Val	Gly	Asp	Ala	Leu	Gu	Ile	Leu	Ser	Asn	Gly	Arg	Oys	His	Ser
			275					280					285			
	gtt	ctt	cac	cga	gga	ctt	gtt	act	aag	gaa	aat	gtt	cgg	atc	tgc	tgg
	Val	Leu	His	Arg	Gly	Leu	Val	Thr	Lys	Gu	Asn	Val	Arg	Ile	Ser	Trp
							295					300				
	gcg	gtt	ttc	tgc	gag	ccg	ccg	agg	gag	aag	gtg	gtg	ctt	cgg	ccg	ctg
	Ala	Val	Phe	Oys	Gu	Pro	Pro	Arg	Gu	Lys	Val	Val	Leu	Arg	Pro	Leu
						310					315					320
	ctg	gag	tig	att	ggg	aag	ggg	gag	gtg	gcg	agg	ttt	gag	ccg	cgg	act
	Leu	Gu	Leu	Ile	Gly	Lys	Gly	Gu	Val	Ala	Arg	Phe	Gu	Pro	Arg	Thr
					325						330				335	
	ttt	gcg	gag	cat	tig	gag	agg	aag	ctg	ttc	aag	ccg	agg	gtg	gag	ggt
	Phe	Ala	Gu	His	Leu	Gu	Arg	Lys	Leu	Phe	Lys	Pro	Arg	Val	Gu	Gly
				340					345					350		
	tgc	ggg	gag	aag	gcg	cct	gtg	gat	tga							
	Oys	Gly	Gu	Lys	Ala	Pro	Val	Asp								
			355					360								
	<210>	12														
	<211>	360														
	<212>	PRT														
5	<213>	Cultivar híbrido de Doritaenopsis (Doritaenopsis Sogo Vivien x Doritaenopsis Sogo Yenlin)														
	<400>	12														
	Met	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Pro	Pro	Thr	Pro	Arg	Val	Gu	Ile	Leu	Ala
	1				5					10					15	
	Asn	Ser	Gly	Leu	Ser	Phe	Ile	Pro	Ala	Gu	Phe	Val	Arg	Pro	Gln	Ser
				20					25					30		
	Gu	Arg	Gln	His	Leu	Gln	Asp	Ser	Leu	Asn	Lys	Asn	Pro	Oys	Gly	Val
			35				40						45			

ES 2 412 704 T3

Gl u Ile Pro Ile Val Asp Leu Gl y Gl y Phe Ser Ser Gl u Gl u Gl y Arg
 50 55 60
 Arg Arg Arg Cys Val Gl u Gl u Val Met Ala Ala Ala Gl u Gl u Trp Gl y
 65 70 75 80
 Val Met Phe Leu Val Asn His Gl y Val Pro Gl u Gl u Leu Ile Gl u Arg
 85 90 95
 Leu Gl n Ala Thr Gl y Lys Gl y Phe Phe Gl u Leu Pro Val Asp Gl u Lys
 100 105 110
 Gl u Lys Tyr Ala Asn Asp Gl n Ser Arg Gl y Gl n Ile Gl n Gl y Tyr Gl y
 115 120 125
 Ser Lys Leu Ala Asn Asn Gl u Asn Gl y Ile Leu Gl u Trp Gl n Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Phe His Leu Val Tyr Pro Pro Gl u Lys Thr Asp Leu Thr Ile Trp
 145 150 155 160
 Pro Thr Gl u Pro Ala Asp Tyr Ile Ala Thr Thr Thr Ser Phe Ala Lys
 165 170 175
 Gl u Leu Arg Thr Leu Ala Ser Lys Met Phe Ser Ile Leu Ser Leu Gl y
 180 185 190
 Leu Gl y Leu Asp Gl n Asn Lys Leu Gl u Ala Gl u Leu Gl y Gl y Gl n Asp
 195 200 205
 Asp Leu Leu Leu Gl n Leu Lys Ile Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Gl n
 210 215 220
 Pro Gl u Leu Ala Leu Gl y Val Gl u Ala His Thr Asp Val Ser Ser Leu
 225 230 235 240
 Ser Phe Ile Leu His Asn Gl y Ile Pro Gl y Leu Gl n Val Phe Lys Asn
 245 250 255
 Gl y Ala Gl y Trp Ile Thr Ala Pro Leu Val Pro Asn Ser Ile Ile Val
 260 265 270
 His Val Gl y Asp Ala Leu Gl u Ile Leu Ser Asn Gl y Arg Cys His Ser
 275 280 285
 Val Leu His Arg Gl y Leu Val Thr Lys Gl u Asn Val Arg Ile Ser Trp
 290 295 300
 Ala Val Phe Cys Gl u Pro Pro Arg Gl u Lys Val Val Leu Arg Pro Leu
 305 310 315 320
 Leu Gl u Leu Ile Gl y Lys Gl y Gl u Val Ala Arg Phe Gl u Pro Arg Thr
 325 330 335
 Phe Ala Gl u His Leu Gl u Arg Lys Leu Phe Lys Pro Arg Val Gl u Gl y
 340 345 350
 Cys Gl y Gl u Lys Ala Pro Val Asp
 355 360

ES 2 412 704 T3

<210> 13
 <211> 1068
 <212> ADN
 <213> Cultivar híbrido de Gerbera
 5 <220>
 <221 > CDS
 <222> (1)..(1068)
 <223> Antocianidina sintasa del cultivar híbrido de Gerbera
 <400> 13
 at g gt g att caa gca acc aca aga gt c gaa agc tta tca acg agc ggc 48
 Met Val Ile G n Ala Thr Thr Arg Val Gu Ser Leu Ser Thr Ser G y
 1 5 10 15
 at c cac cag at c ccg aaa gaa tac at c cgc cca caa gaa gaa cta aga 96
 Ile His G n Ile Pro Lys Gu Tyr Ile Arg Pro G n Gu Gu Leu Arg
 20 25 30
 agc at c aca aac at c ttc gac gaa gaa aca aac aag caa aaa cca caa 144
 Ser Ile Thr Asn Ile Phe Asp Gu Gu Thr Asn Lys G n Lys Pro G n
 35 40 45
 gt c ccc acc gt g gat cta acg gac at c gaa tcc gac gac ccg gaa aaa 192
 Val Pro Thr Val Asp Leu Thr Asp Ile Gu Ser Asp Asp Pro Gu Lys
 50 55 60
 aga cac aag tgt ttg gaa gag ctt aag aaa gcg gcc at g gag tgg ggt 240
 Arg His Lys Cys Leu Gu Gu Leu Lys Lys Ala Ala Met Gu Trp G y
 65 70 75 80
 gtt at g cat gt c gt g aac cat gga gt c tcc ggc gac ttg att ggc cgt 288
 Val Met His Val Val Asn His G y Val Ser G y Asp Leu Ile G y Arg
 85 90 95
 gtt aag gcc gcc ggc gag ggg ttt ttt ggg ct g ccg gt g gag gag aag 336
 Val Lys Ala Ala G y Gu G y Phe Phe G y Leu Pro Val Gu Gu Lys
 100 105 110
 gag agg tat ggg aat gat cca gac gga ggg agg att caa ggg tat gga 384
 Gu Arg Tyr G y Asn Asp Pro Asp G y G y Arg Ile G n G y Tyr G y
 115 120 125
 agt aaa ttg gct aat aat gct tct ggg cag ctt gaa tgg gag gat tac 432
 Ser Lys Leu Ala Asn Asn Ala Ser G y G n Leu Gu Trp Gu Asp Tyr
 130 135 140
 ttt ttt cac ctt gt g ttc ccg gag gag aaa cgt gat ttg acc att tgg 480
 Phe Phe His Leu Val Phe Pro Gu Gu Lys Arg Asp Leu Thr Ile Trp
 145 150 155 160
 ccc acg acg cct agt gac tac acc gat gcc acc acc gag tat gct aag 528
 Pro Thr Thr Pro Ser Asp Tyr Thr Asp Ala Thr Thr Gu Tyr Ala Lys
 165 170 175

10

ES 2 412 704 T3

cag cta cga gca ttg gca acc aag ata ct c t cg gcg cta tct tta ggg 576
 Gn Leu Arg Ala Leu Ala Thr Lys Ile Leu Ser Ala Leu Ser Leu Gy
 180 185 190

tta gga ttg gag gag ggt cgg cta gag aaa gag gta gga ggg ata gag 624
 Leu Gy Leu Gu Gu Gy Arg Leu Gu Lys Gu Val Gy Gy Ile Gu
 195 200 205

gag ctt atc ctt caa cta aag att aac tat tac cca aaa tgc cct caa 672
 Gu Leu Ile Leu Gn Leu Lys Ile Asn Tyr Tyr Pro Lys Oys Pro Gn
 210 215 220

ccc gag cta gcc ctt ggt gtg gaa gct cac acc gat gta agt gca ct c 720
 Pro Gu Leu Ala Leu Gy Val Gu Ala His Thr Asp Val Ser Ala Leu
 225 230 235 240

acg ttc atc ct c cac aac atg gt c cca ggg ct c caa ct c ttc tat gac 768
 Thr Phe Ile Leu His Asn Met Val Pro Gy Leu Gn Leu Phe Tyr Asp
 245 250 255

gga caa tgg gtt agt gca caa tgt gtg cca gac tcc atc atc tta cac 816
 Gy Gn Trp Val Ser Ala Gn Oys Val Pro Asp Ser Ile Ile Leu His
 260 265 270

att ggt gac acc ctt gag atc ct g agt aat gga aaa tac aag agt at c 864
 Ile Gy Asp Thr Leu Gu Ile Leu Ser Asn Gy Lys Tyr Lys Ser Ile
 275 280 285

ct c cat agg ggg ct c gt g aac aaa gag aag gt c agg att tct tgg gcg 912
 Leu His Arg Gy Leu Val Asn Lys Gu Lys Val Arg Ile Ser Trp Ala
 290 295 300

gtt ttt tgt gaa ccg ccc aag gag aaa atc atc ct g aaa ccg ttg cca 960
 Val Phe Oys Gu Pro Pro Lys Gu Lys Ile Ile Leu Lys Pro Leu Pro
 305 310 315 320

gag acg gtt tct gag gca gag ccg cca ct c ttt ccg cct cgg acc ttt 1008
 Gu Thr Val Ser Gu Ala Gu Pro Pro Leu Phe Pro Pro Arg Thr Phe
 325 330 335

cag caa cat atg gaa cac aag ttg ttt agg aag aat aaa gac gaa gtg 1056
 Gn Gn His Met Gu His Lys Leu Phe Arg Lys Asn Lys Asp Gu Val
 340 345 350

atg caa aac tag 1068
 Met Gn Asn
 355

<210> 14
 <211> 355
 <212> PRT
 5 <213> Cultivar híbrido de Gerbera
 <400> 14
 Met Val Ile Gn Ala Thr Thr Arg Val Gu Ser Leu Ser Thr Ser Gy
 1 5 10 15
 Ile His Gn Ile Pro Lys Gu Tyr Ile Arg Pro Gn Gu Gu Leu Arg
 20 25 30
 Ser Ile Thr Asn Ile Phe Asp Gu Gu Thr Asn Lys Gn Lys Pro Gn
 35 40 45
 Val Pro Thr Val Asp Leu Thr Asp Ile Gu Ser Asp Asp Pro Gu Lys

ES 2 412 704 T3

<213> Cultivar híbrido de Doritaenopsis (Doritaenopsis Queen Beer)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1140)

5 <223> Dihidroflavonol 4-reductasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis

<400> 15

atg gag gat gtg agg aag ggt cct gtt gtg gtg acg gga gcc agc ggg	48
Met Gu Asp Val Arg Lys Gy Pro Val Val Val Thr Gy Ala Ser Gy	
1 5 10 15	
tac gtg ggt tca tgg ctg gtt atg aag ctt ctt cga aag ggt tat gag	96
Tyr Val Gy Ser Trp Leu Val Met Lys Leu Leu Arg Lys Gy Tyr Gu	
20 25 30	
gtc agg gct aca gtc aga gat cca aca aat tct aaa aaa gtg aag ccg	144
Val Arg Ala Thr Val Arg Asp Pro Thr Asn Ser Lys Lys Val Lys Pro	
35 40 45	
ttg ttg gat ctt ccg ggc tcg aat gaa ctg ctg agc ata tgg aaa gca	192
Leu Leu Asp Leu Pro Gy Ser Asn Gu Leu Leu Ser lle Trp Lys Ala	
50 55 60	
gat cta aat gac att gaa ggg agc ttc gat gag gtg ata cgt ggt tgt	240
Asp Leu Asn Asp lle Gu Gy Ser Phe Asp Gu Val lle Arg Gy Cys	
65 70 75 80	
gtt ggg gtg ttc cat gtc gct act ccc atg aat ttt caa tcc aaa gac	288
Val Gy Val Phe His Val Ala Thr Pro Met Asn Phe Gn Ser Lys Asp	
85 90 95	
cct gag aac gaa gtg ata caa ccg gca atc aac ggt ttg ctg agc atc	336
Pro Gu Asn Gu Val lle Gn Pro Ala lle Asn Gy Leu Leu Ser lle	
100 105 110	
ctg agg tca tgc aaa agg tcg ggc agc gta agg cgc gtg atc ttc aca	384
Leu Arg Ser Cys Lys Arg Ser Gy Ser Val Arg Arg Val lle Phe Thr	
115 120 125	
tct tcc gca gga aca gtc aac gtg gag gaa cgc cga gca ccg gtg tac	432
Ser Ser Ala Gy Thr Val Asn Val Gu Gu Arg Arg Ala Pro Val Tyr	
130 135 140	
gac gag agc tcc tgg agc gac ctg gat ttc atc acc cgt gtc aaa atg	480
Asp Gu Ser Ser Trp Ser Asp Leu Asp Phe lle Thr Arg Val Lys Met	
145 150 155 160	
acc ggt tgg atg tac ttc gta tca aaa aca ctt gcg gag aag gct gct	528
Thr Gy Trp Met Tyr Phe Val Ser Lys Thr Leu Ala Gu Lys Ala Ala	
165 170 175	
tgg gag ttt gtg aaa gaa aat gac gtt gat ttt ata gcc ata att ccc	576
Trp Gu Phe Val Lys Gu Asn Asp Val Asp Phe lle Ala lle lle Pro	
180 185 190	

ES 2 412 704 T3

act ttg gtg gtg ggt tcc ttc ata aca gat gag atg ccg cca agt ttg 624
 Thr Leu Val Val Gly Ser Phe Ile Thr Asp Gu Met Pro Pro Ser Leu
 195 200 205

acc act gca ttt tca tta att aca gga aat gaa gct cat tac tcg ata 672
 Thr Thr Ala Phe Ser Leu Ile Thr Gly Asn Gu Ala His Tyr Ser Ile
 210 215 220

ata aag caa gct caa ttt gtt cat ttg gat gac tta tgt gat gct cat 720
 Ile Lys Gn Ala Gn Phe Val His Leu Asp Asp Leu Oys Asp Ala His
 225 230 235 240

att ttc ctt ttc gaa cat ccc gaa gca aat ggt agg tac att tgt tct 768
 Ile Phe Leu Phe 245 His Pro Gu Ala Asn Gly Arg Tyr Ile Cys Ser
 250 255

tca cat gat tcg aca att tat gac ttg gca aaa atg ctg aag aag aga 816
 Ser His Asp Ser Thr Ile Tyr Asp Leu Ala Lys Met Leu Lys Lys Arg
 260 265 270

tat gcc aca tat gcc ata cct caa gag ttt aaa gat att gat cca aat 864
 Tyr Ala Thr Tyr Ala Ile Pro Gn Gu Phe Lys Asp Ile Asp Pro Asn
 275 280 285

att aag aga gtg agt ttc tct tct aag aag ttc atg gac ttg ggg ttc 912
 Ile Lys Arg Val Ser Phe Ser Ser Lys Lys Phe Met Asp Leu Gly Phe
 290 295 300

aag tac aag tac act att gag gag atg ttt gat gat gct att aag acc 960
 Lys Tyr Lys Tyr Thr Ile Gu Gu Met Phe Asp Asp Ala Ile Lys Thr
 305 310 315 320

tgc agg gaa aag aat ctc tta ccg ccc aac act gag gaa cca gcc tta 1008
 Oys Arg Gu Lys Asn 325 Leu Leu Pro Pro Asn Thr Gu Gu Pro Ala Leu
 330 335

ctt gcc gaa aag tac gaa gaa atg aaa gaa caa ttg cag tta agt gaa 1056
 Leu Ala Gu Lys Tyr Gu Gu Met Lys Gu Gn Leu Gn Leu Ser Gu
 340 345 350

aga aga atg aga agt ttg aaa att ctt tat gtt atc ctt tta ttt aca 1104
 Arg Arg Met Arg Ser Leu Lys Ile Leu Tyr Val Ile Leu Leu Phe Thr
 355 360 365

cat ctg ctt tat tat gca tgg tta tat ctt gac tga 1140
 His Leu Leu Tyr Tyr Ala Trp Leu Tyr Leu Asp
 370 375

<210> 16
 <211> 379
 <212> PRT
 5 <213> Cultivar híbrido de Doritaenopsis (Doritaenopsis Queen Beer)
 <400> 16
 Met Gu Asp Val Arg Lys Gly Pro Val Val Val Thr Gly Ala Ser Gly
 1 5 10 15
 Tyr Val Gly Ser Trp Leu Val Met Lys Leu Leu Arg Lys Gly Tyr Gu
 20 25 30
 Val Arg Ala Thr Val Arg Asp Pro Thr Asn Ser Lys Lys Val Lys Pro
 35 40 45

ES 2 412 704 T3

Leu 50 Leu Asp Leu Pro Gly Ser 55 Asn Glu Leu Leu Ser 60 Ile Trp Lys Ala
 Asp 65 Leu Asn Asp Ile Glu 70 Gly Ser Phe Asp Glu 75 Val Ile Arg Gly Cys 80
 Val Gly Val Phe His 85 Val Ala Thr Pro Met 90 Asn Phe Glu Ser Lys 95 Asp
 Pro Glu Asn Glu 100 Val Ile Glu Pro Ala 105 Ile Asn Gly Leu Leu 110 Ser Ile
 Leu Arg Ser 115 Cys Lys Arg Ser Gly 120 Ser Val Arg Arg Val 125 Ile Phe Thr
 Ser Ser 130 Ala Gly Thr Val Asn 135 Val Glu Glu Arg Arg 140 Ala Pro Val Tyr
 Asp Glu Ser Ser Trp Ser 150 Asp Leu Asp Phe Ile 155 Thr Arg Val Lys Met 160
 Thr Gly Trp Met Tyr 165 Phe Val Ser Lys Thr 170 Leu Ala Glu Lys Ala 175 Ala
 Trp Glu Phe Val 180 Lys Glu Asn Asp Val 185 Asp Phe Ile Ala Ile Ile Pro
 Thr Leu Val 195 Val Gly Ser Phe Ile 200 Thr Asp Glu Met Pro 205 Pro Ser Leu
 Thr Thr 210 Ala Phe Ser Leu Ile 215 Thr Gly Asn Glu Ala 220 His Tyr Ser Ile
 Ile Lys Glu Ala Glu Phe Val His Leu Asp Asp 235 Leu Cys Asp Ala His 240
 Ile Phe Leu Phe Glu 245 His Pro Glu Ala Asn Gly Arg Tyr Ile Cys 255 Ser
 Ser His Asp Ser 260 Thr Ile Tyr Asp Leu 265 Ala Lys Met Leu Lys 270 Lys Arg
 Tyr Ala Thr Tyr Ala Ile Pro Glu 280 Glu Phe Lys Asp Ile 285 Asp Pro Asn
 Ile Lys Arg Val Ser Phe Ser 295 Ser Lys Lys Phe Met 300 Asp Leu Gly Phe
 Lys Tyr Lys Tyr Thr Ile Glu Glu Met Phe Asp 315 Asp Ala Ile Lys Thr 320
 Cys Arg Glu Lys Asn Leu Leu Pro Pro Asn Thr Glu Glu Pro Ala Leu

ES 2 412 704 T3

	325		330		335
	Leu Ala Glu Lys Tyr Glu Glu Met Lys Glu Gln Leu Gln Leu Ser Glu				
	340		345		350
	Arg Arg Met Arg Ser Leu Lys Ile Leu Tyr Val Ile Leu Leu Phe Thr				
	355		360		365
	His Leu Leu Tyr Tyr Ala Trp Leu Tyr Leu Asp				
	370		375		
	<210> 17				
	<211> 42				
	<212> ADN				
5	<213> Artificial				
	<220>				
	<223> Oligonucleótido SAS-S				
	<400> 17				
	ct agct agcg gcgcgct gc aggat at cat t t aaat cccg gg			42	
10	<210> 18				
	<211> 42				
	<212> ADN				
	<213> Artificial				
	<220>				
15	<223> Oligonucleótido SAS- AS				
	<400> 18				
	ccgggatttt aaatgatc ctgcaggcgc gccgtagct ag			42	
	<210> 19				
	<211> 30				
20	<212> ADN				
	<213> Artificial				
	<220>				
	<223> Cebador T-CalMV35S-Ssel-F				
	<400> 19				
25	aacct gcagg aaat caccag t ct ct ct ct a			30	
	<210> 20				
	<211> 27				
	<212> ADN				
	<213> Artificial				
30	<220>				
	<223> Cebador T- CaMV35S- Ascl - R				
	<400> 20				
	ggcgcccat cgat aagggg t t at t ag			27	
	<210> 21				
35	<211> 21				
	<212> ADN				
	<213> Artificial				
	<220>				
	<223> Cebador PhCHS3 F1				
40	<400> 21				
	aagcttga gagacgacgg a			21	
	<210> 22				
	<211> 20				
	<212> ADN				
45	<213> Artificial				
	<220>				
	<223> Cebador PHCHS3 R1				
	<400> 22				
	t ggcct aat cct t caaat t			20	
50	<210> 23				
	<211> 1185				
	<212> ADN				
	<213> Cultivar híbrido de Doritaenopsis (Doritaenopsis Sogo Vivien x Doritaenopsis Sogo Yenlin)				
	<220>				

ES 2 412 704 T3

<221> CDS

<222> (1)..(1185)

<223> Chalcona sintasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis

<400> 23

atg	gcg	ccg	gcg	atg	gag	gag	atc	agg	cga	act	cag	aga	gct	gag	ggc		48
Met	Ala	Pro	Ala	Met	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Thr	Gln	Arg	Ala	Glu	Gly		
1				5				10						15			
ccc	gcg	gcg	gtg	ctc	gca	atc	ggc	acc	tcc	acg	ccg	ccg	aac	gct	ctg		96
Pro	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ile	Gly	Thr	Ser	Thr	Pro	Pro	Asn	Ala	Leu		
			20					25					30				
tat	cag	gcc	gat	tat	ccc	gat	tat	tac	ttc	aga	atc	acc	aac	tgc	gag		144
Tyr	Gln	Ala	Asp	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Arg	Ile	Thr	Asn	Cys	Glu		
		35					40					45					
cat	ctc	act	gac	ctc	aag	gag	aag	ttc	aag	cga	atg	tgc	gag	aaa	tcc		192
His	Leu	Thr	Asp	Leu	Lys	Glu	Lys	Phe	Lys	Arg	Met	Cys	Glu	Lys	Ser		
		50				55					60						
atg	ata	aaa	aaa	cgg	tac	atg	tat	cta	aca	gaa	gaa	ttc	ctg	aaa	gaa		240
Met	Ile	Lys	Lys	Arg	Tyr	Met	Tyr	Leu	Thr	Glu	Glu	Phe	Leu	Lys	Glu		
65				70						75				80			
aat	ccc	aat	atc	tgc	gca	ttc	atg	gct	cct	tca	ctc	gac	gcc	cgg	caa		288
Asn	Pro	Asn	Ile	Cys	Ala	Phe	Met	Ala	Pro	Ser	Leu	Asp	Ala	Arg	Gln		
				85					90					95			
gac	ata	gtt	gtc	gcc	gag	gtc	ccg	aag	ctc	gcc	aaa	gag	gcc	gcc	gcg		336
Asp	Ile	Val	Val	Ala	Glu	Val	Pro	Lys	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala		
			100					105					110				
cgc	gcc	atc	aag	gaa	tgg	gga	cac	ccc	aaa	tca	cgc	ata	act	cat	ctc		384
Arg	Ala	Ile	Lys	Glu	Trp	Gly	His	Pro	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	His	Leu		
		115				120						125					
atc	ttc	tgc	acc	acc	agc	ggc	gtc	gac	atg	ccc	ggc	gcc	gac	tac	caa		432
Ile	Phe	Cys	Thr	Thr	Ser	Gly	Val	Asp	Met	Pro	Gly	Ala	Asp	Tyr	Gln		
		130				135					140						
ctc	acc	cgc	ctc	ctc	ggt	ctc	cgc	ccc	tcc	gtc	aac	aga	ttc	atg	ctc		480
Leu	Thr	Arg	Leu	Leu	Gly	Leu	Arg	Pro	Ser	Val	Asn	Arg	Phe	Met	Leu		

5

ES 2 412 704 T3

145	150	155	160													
tac Tyr	cag G n	cag G n	ggc G y	tgc Cys 165	ttc Phe	gcc Al a	ggc G y	ggc G y	acc Thr 170	gtc Val	ctc Leu	cgc Arg	ctc Leu	gcc Al a 175	aag Lys	528
gat Asp	ctc Leu	gcc Al a	gag G u 180	aac Asn	aac Asn	gcc Al a	ggc G y	gcc Al a 185	cgc Arg	gtg Val	ctc Leu	gtc Val	gtt Val 190	tgc Cys	tcc Ser	576
gaa G u	atc I l e	acc Thr 195	gcc Al a	gtc Val	act Thr	ttc Phe	cgc Arg 200	ggc G y	ccg Pro	tcg Ser	gaa G u	tcc Ser 205	cat H i s	ctc Leu	gat Asp	624
tcc Ser	ctc Leu 210	gtc Val	gga G y	cag G n	gcg Al a	ctc Leu 215	ttc Phe	ggc G y	gac Asp	ggc G y	gcc Al a 220	gcc Al a	gct Al a	atc I l e	att I l e	672
gtc Val 225	gga G y	tcc Ser	gac Asp	cct Pro	gat Asp 230	tta Leu	gcc Al a	acc Thr	gag G u	cgc Arg 235	cct Pro	ctg Leu	ttt Phe	caa G n	cta Leu 240	720
gtc Val	tct Ser	gct Al a	tcc Ser	caa G n 245	acc Thr	atc I l e	ctt Leu	ccc Pro	gaa G u 250	tca Ser	gag G u	ggc G y	gcc Al a	att I l e 255	gat Asp	768
ggc G y	cac H i s	ctt Leu	cgt Arg 260	gaa G u	atc I l e	ggg G y	ctc Leu	acc Thr 265	ttc Phe	cac H i s	cta Leu	ctc Leu	aaa Lys 270	gac Asp	gtc Val	816
ccc Pro	ggc G y	ctc Leu 275	att I l e	tct Ser	aaa Lys	aac Asn	att I l e 280	caa G n	aaa Lys	tgt Cys	ctc Leu	ctt Leu 285	gag G u	gcc Al a	ttc Phe	864
aag Lys	cca Pro 290	ctt Leu	ggt G y	gtg Val	ctt Leu	gat Asp 295	tgg Trp	aac Asn	tct Ser	att I l e	ttt Phe 300	tgg Trp	atc I l e	gct Al a	cac H i s	912
ccg Pro 305	ggc G y	ggc G y	ccg Pro	gct Al a	ata I l e 310	ctc Leu	gat Asp	caa G n	gtt Val	gag G u 315	acc Thr	aag Lys	ctc Leu	ggt G y	cta Leu 320	960
aag Lys	tcc Ser	gag G u	aag Lys	ctc Leu 325	gcc Al a	gcg Al a	agt Ser	aga Arg	aat Asn 330	gtg Val	ctc Leu	gct Al a	gac Asp	tac Tyr 335	ggt G y	1008
aac Asn	atg M e t	tcg Ser	agc Ser 340	gca Al a	tgc Cys	gtt Val	ctt Leu	ttc Phe 345	ata I l e	ctc Leu	gat Asp	gag G u	atg M e t 350	cga Arg	agg Arg	1056
cga Arg	tcg Ser	gca Al a 355	gag G u	gct Al a	ggg G y	cag G n	tcg Ser 360	acc Thr	act Thr	ggc G y	gag G u	ggt G y 365	ttg Leu	gag G u	tgg Trp	1104
gga G y	gtt Val 370	cta Leu	ttc Phe	ggg G y	ttc Phe	ggt G y 375	ccg Pro	gga G y	ctt Leu	acg Thr	gtc Val 380	gag G u	act Thr	gtt Val	gta Val	1152
tta Leu 385	cgc Arg	agc Ser	gtt Val	ccg Pro	att I l e 390	ggt G y	ggc G y	acc Thr	gag G u	t a a						1185
<210>	24															
<211>	394															
<212>	PRT															
5 <213>	Cultivar híbrido de Doritaenopsis (Doritaenopsis Sogo Vivien x Doritaenopsis Sogo Yenlin)															
<400>	24															

ES 2 412 704 T3

Met Ala Pro Ala Met Glu Glu Ile Arg Arg Thr Gn Arg Ala Glu Gly
 1 5 10 15
 Pro Ala Ala Val Leu Ala Ile Gly Thr Ser Thr Pro Pro Asn Ala Leu
 20 25 30
 Tyr Gn Ala Asp Tyr Pro Asp Tyr Tyr Phe Arg Ile Thr Asn Cys Gu
 35 40 45
 His Leu Thr Asp Leu Lys Glu Lys Phe Lys Arg Met Cys Gu Lys Ser
 50 55 60
 Met Ile Lys Lys Arg Tyr Met Tyr Leu Thr Gu Gu Phe Leu Lys Gu
 65 70 75 80
 Asn Pro Asn Ile Cys Ala Phe Met Ala Pro Ser Leu Asp Ala Arg Gn
 85 90 95
 Asp Ile Val Val Ala Gu Val Pro Lys Leu Ala Lys Gu Ala Ala Ala
 100 105 110
 Arg Ala Ile Lys Gu Trp Gly His Pro Lys Ser Arg Ile Thr His Leu
 115 120 125
 Ile Phe Cys Thr Thr Ser Gly Val Asp Met Pro Gly Ala Asp Tyr Gn
 130 135 140
 Leu Thr Arg Leu Leu Gly Leu Arg Pro Ser Val Asn Arg Phe Met Leu
 145 150 155 160
 Tyr Gn Gn Gly Cys Phe Ala Gly Gly Thr Val Leu Arg Leu Ala Lys
 165 170 175
 Asp Leu Ala Gu Asn Asn Ala Gly Ala Arg Val Leu Val Val Cys Ser
 180 185 190
 Gu Ile Thr Ala Val Thr Phe Arg Gly Pro Ser Gu Ser His Leu Asp
 195 200 205
 Ser Leu Val Gly Gn Ala Leu Phe Gly Asp Gly Ala Ala Ala Ile Ile
 210 215 220
 Val Gly Ser Asp Pro Asp Leu Ala Thr Gu Arg Pro Leu Phe Gn Leu
 225 230 235 240
 Val Ser Ala Ser Gn Thr Ile Leu Pro Gu Ser Gu Gly Ala Ile Asp
 245 250 255
 Gly His Leu Arg Gu Ile Gly Leu Thr Phe His Leu Leu Lys Asp Val
 260 265 270

ES 2 412 704 T3

Pro Gly Leu Ile Ser Lys Asn Ile Gln Lys Cys Leu Leu Glu Ala Phe
 275 280 285

Lys Pro Leu Gly Val Leu Asp Trp Asn Ser Ile Phe Trp Ile Ala His
 290 295 300

Pro Gly Gly Pro Ala Ile Leu Asp Gln Val Glu Thr Lys Leu Gly Leu
 305 310 315 320

Lys Ser Glu Lys Leu Ala Ala Ser Arg Asn Val Leu Ala Asp Tyr Gly
 325 330 335

Asn Met Ser Ser Ala Cys Val Leu Phe Ile Leu Asp Glu Met Arg Arg
 340 345 350

Arg Ser Ala Glu Ala Gly Gln Ser Thr Thr Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 355 360 365

Gly Val Leu Phe Gly Phe Gly Pro Gly Leu Thr Val Glu Thr Val Val
 370 375 380

Leu Arg Ser Val Pro Ile Gly Gly Thr Glu
 385 390

- <210> 25
- <211> 26
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador CHI - dgF1
- <400> 25
- 10 tftctcgsygbgcmgygw vmgvvgg 26
- <210> 26
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 15 <223> Cebador CHI-dgR1
- <220>
- <221 > base_modificada
- <222> (5)..(20)
- <223> n(5,8,20) = i
- 20 <400> 26
- cmgnganac vsrctkyn ccratvat 28
- <210> 27
- <211> 25
- <212> ADN
- 25 <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador CHI - dgF3
- <220>
- <221 > base_modificada
- 30 <222> (3)..(14)
- <223> n(3,11,14) = i
- <400> 27
- trmkywcmgg nsrmttygar aar yt 25
- <210> 28
- 35 <211> 26
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador CHI - dgR3
- 40 <400> 28

ES 2 412 704 T3

	tyaccratva tagwhtccar aaybgc	26
	<210> 29	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PhCHI - GSP F1	
	<400> 29	
	at gct gct gc cattaacggg tca	23
10	<210> 30	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador PhCHI-GSP F2	
	<400> 30	
	tccgagaagg tctccggaa ct	22
	<210> 31	
	<211> 24	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PhCHI - GSP R1	
	<400> 31	
25	gcatgtca gcttctgct ct ct	24
	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador PhCHI-GSP R2	
	<400> 32	
	at cacat cag t ct cagccac a	21
	<210> 33	
35	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PhCHI init	
40	<400> 33	
	atggcagaaa cagtggcgac gccca	25
	<210> 34	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PhCHI t er m	
	<400> 34	
	t caaacgact ccatcttgct c	21
50	<210> 35	
	<211> 723	
	<212> ADN	
	<213> Cultivar híbrido de Doritaenopsis (Doritaenopsis Sogo Vivien x Doritaenopsis Sogo Yenlin)	
	<220>	
55	<221> CDS	
	<222> (1)..(723)	
	<223> Chalcona isomerasa del cultivar híbrido de Doritaenopsis	
	<400> 35	

ES 2 412 704 T3

atg gca gaa aca gtg gcg acg ccc atc gag gtg gag gga gtg aag ttt 48
Met Ala Gu Thr Val Ala Thr Pro Ile Gu Val Gu Gy Val Lys Phe
1 5 10 15

ccg gcc gag atc tcg tcg ccg gcg acc tcg aaa cct cta ttt ctg ggt 96
Pro Ala Gu Ile Ser Ser Pro Ala Thr Ser Lys Pro Leu Phe Leu Gy
20 25 30

ggc gca ggg gcg agg ggt ata gaa gtt gga gga aag ttt tta gcc gta 144
Gy Ala Gy Ala Arg Gy Ile Gu Val Gy Gy Lys Phe Leu Ala Val
35 40 45

acc gcg atc gga gtg tac ttg gaa gcg gcg gtg att ccg gcg atc gcc 192
Thr Ala Ile Gy Val Tyr Leu Gu Ala Ala Val Ile Pro Ala Ile Ala
50 55 60

gga aaa tgg acg ggg aag aag gcg gag aag ctg act gat tcg gtt gac 240
Gy Lys Trp Thr Gy Lys Lys Ala Gu Lys Leu Thr Asp Ser Val Asp
65 70 75 80

ttt tac cga gac att att aca ggt tcc ttt gag aag ctg acg aga gtg 288
Phe Tyr Arg Asp Ile Ile Thr Gy Ser Phe Gu Lys Leu Thr Arg Val
85 90 95

acg atg ctg ctg cca tta acg ggt caa cag tac tcc gag aag gtc tcc 336
Thr Met Leu Leu Pro Leu Thr Gy Gn Gn Tyr Ser Gu Lys Val Ser
100 105 110

ggg aac tgc gtc gcc gca tgg aaa gcc gcc gga gaa tac aca gag gaa 384
Gy Asn Cys Val Ala Ala Trp Lys Ala Ala Gy Gu Tyr Thr Gu Gu
115 120 125

gaa gca acg gcc att aat aag ttt ctg gaa atc ttc aag cct aag aac 432
Gu Ala Thr Ala Ile Asn Lys Phe Leu Gu Ile Phe Lys Pro Lys Asn
130 135 140

ttt ctt cca ggc acc tcc atc atc ttc act cat tcc cct cat ggc tct 480
Phe Leu Pro Gy Thr Ser Ile Ile Phe Thr His Ser Pro His Gy Ser
145 150 155 160

ctc act att gga ttt ttg gag ggg gat ggc gtt cct gtg gct gag act 528
Leu Thr Ile Gy Phe Leu Gu Gy Asp Gy Val Pro Val Ala Gu Thr
165 170 175

gat gtg ata gag agc aag aag ctg acg aat gcg gtg ttg gaa tcc att 576
Asp Val Ile Gu Ser Lys Lys Leu Thr Asn Ala Val Leu Gu Ser Ile
180 185 190

ata ggg gag aat gga gtt tct ccc gct gcg aaa cag agc ctg gct cgg 624
Ile Gy Gu Asn Gy Val Ser Pro Ala Ala Lys Gn Ser Leu Ala Arg
195 200 205

agg ttt tca gag ctt ctg aat aag aaa gaa gac caa gaa gaa gaa gat 672
Arg Phe Ser Gu Leu Leu Asn Lys Lys Gu Asp Gn Gu Gu Gu Asp
210 215 220

ggg att ttg gat gtg gag aaa gcc aaa tta gag caa gat gga gtc gtt 720
Gy Ile Leu Asp Val Gu Lys Ala Lys Leu Gu Gn Asp Gy Val Val
225 230 235 240

tga 723

5

<210> 36
<211> 240
<212> PRT
<213> del cultivar híbrido de Doritaenopsis (Doritaenopsis Sogo Vivien x Doritaenopsis Sogo Yenlin)
<400> 36

ES 2 412 704 T3

Met Ala Gu Thr Val Ala Thr Pro Ile Gu Val Gu Gy Val Lys Phe
 1 5 10 15

Pro Ala Gu Ile Ser Ser Pro Ala Thr Ser Lys Pro Leu Phe Leu Gy
 20 25 30

Gy Ala Gy Ala Arg Gy Ile Gu Val Gy Gy Lys Phe Leu Ala Val
 35 40 45

Thr Ala Ile Gy Val Tyr Leu Gu Ala Ala Val Ile Pro Ala Ile Ala
 50 55 60

Gy Lys Trp Thr Gy Lys Lys Ala Gu Lys Leu Thr Asp Ser Val Asp
 65 70 75 80

Phe Tyr Arg Asp Ile Ile Thr Gy Ser Phe Gu Lys Leu Thr Arg Val
 85 90 95

Thr Met Leu Leu Pro Leu Thr Gy Gn Gn Tyr Ser Gu Lys Val Ser
 100 105 110

Gy Asn Cys Val Ala Ala Trp Lys Ala Ala Gy Gu Tyr Thr Gu Gu
 115 120 125

Gu Ala Thr Ala Ile Asn Lys Phe Leu Gu Ile Phe Lys Pro Lys Asn
 130 135 140

Phe Leu Pro Gy Thr Ser Ile Ile Phe Thr His Ser Pro His Gy Ser
 145 150 155 160

Leu Thr Ile Gy Phe Leu Gu Gy Asp Gy Val Pro Val Ala Gu Thr
 165 170 175

Asp Val Ile Gu Ser Lys Lys Leu Thr Asn Ala Val Leu Gu Ser Ile
 180 185 190

Ile Gy Gu Asn Gy Val Ser Pro Ala Ala Lys Gn Ser Leu Ala Arg
 195 200 205

Arg Phe Ser Gu Leu Leu Asn Lys Lys Gu Asp Gn Gu Gu Gu Asp
 210 215 220

Gy Ile Leu Asp Val Gu Lys Ala Lys Leu Gu Gn Asp Gy Val Val
 225 230 235 240

5 <210> 37
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador F3H- dgF1

10 <220>
 <221 > base_modificada
 <222> (2)..(23)
 <223> n(2,5,23) = i
 <400> 37

15 tnvngaygargabgarmgb ccnaa
 <210> 38
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>

25

<223> Cebador F3H- dgR1
 <400> 38
 acbgcygrt grtchgrtt ct t r aa 26
 <210> 39
 5 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador F3H- dgF3
 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> n(24) = i
 <400> 39
 15 aarytbrgkt tygayatgwc hggng 25
 <210> 40
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador F3H- dgR3
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 25 <223> n(18) = i
 <400> 40
 gghwsracvg tdatccangwbtt 23
 <210> 41
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhF3H- GSPF1
 <400> 41
 35 t t ct cat acc caat cgggag 20
 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador PhF3H- GSPF2
 <400> 42
 aat cgggagc cgcgat t act 20
 <210> 43
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhF3H- GSPR1
 <400> 43
 50 t ct gt gt ggc gct t caggcc 20
 <210> 44
 <211> 23
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhF3H- GSPR2
 <400> 44
 tgaggctcgg ttgctggcat t t t 23
 60 <210> 45
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

ES 2 412 704 T3

<223> Cebador PhF3H inic.
 <400> 45
 at ggcccaa t accat t cct accga 25
 <210> 46
 5 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhF3H t er m
 10 <400> 46
 cct t aagct a aaatctcatt taatgccttt gct cc 35
 <210> 47
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador F3HDF3
 <220>
 <221 > base_modificada
 20 <222> (3)..(21)
 <223> n(3,21) = i
 <400> 47
 gcnt ayaayt aycar gayyt ngnttt 26
 <210> 48
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador F3HD- R4-2
 30 <220>
 <221 > base_modificada
 <222> (3)..(12)
 <223> n(3,9,12) = i
 <400> 48
 35 gcncxytgna rngtnarnc 20
 <210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador F3HDF4
 <220>
 <221 > base_modificada
 <222> (6)..(15)
 45 <223> n(6,15) = i
 <400> 49
 gaytngnt tygcncnta ygg 23
 <210> 50
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador F3HD- R3- 2
 <220>
 55 <221> base_modificada
 <222> (4)..(13)
 <223> n(4,7,10,13) = i
 <400> 50
 datncknckn ccngcncra angg 24
 60 <210> 51
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

<223> Cebador F3HDF5
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(21)
 5 <223> n(10,11,12,18,21) = i
 <400> 51
 garttyaarn nnatggngt ngarytnatg 30
 <210> 52
 <211> 19
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador F3HD- R1- 3
 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> n(6) = i
 <400> 52
 ggrtcnckng cdatngccc 19
 20 <210> 53
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador PhF3dH- F7
 <400> 53
 agggcgaagt t aat ggt gga ggcagt gat a 30
 <210> 54
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhF3dH- F8
 <400> 54
 35 aagttaatgg t ggaggcagt gat at gct ga 30
 <210> 55
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador PhF3dH- R6
 <400> 55
 cact gcct cc accat t aact t cgcct t ct 30
 <210> 56
 45 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhF3dH- R5
 <400> 56
 50 cctccacat taactcgcc cttctctatt 30
 <210> 57
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhF3dH- F11E4
 <400> 57
 60 aagaagcaaa tggcattctt aacct acct g 30
 <210> 58
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

	<223> Cebador PhF3dH- R7G11	
	<400> 58	
	ttatcactgc ctccaccatt aact t cgccc	30
	<210> 59	
5	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador DFRD- F1	
10	<220>	
	<221 > base_modificada	
	<222> (9)..(12)	
	<223> n(9,12) = i	
	<400> 59	
15	ttycaygtng cnacnccnat g	21
	<210> 60	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador DFRD- R1	
	<400> 60	
	dat ngcr t cr t cr aacat yt c	21
	<210> 61	
25	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador DFRD- F2	
30	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (15)..(15)	
	<223> n(15) = i	
	<400> 61	
35	atgaayttyc arwsnrarga ycc	23
	<210> 62	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador DFRD- R2	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (4)..(15)	
45	<223> n(4,10,15) = i	
	<400> 62	
	rcanatrtan ckncnrting c	21
	<210> 63	
	<211> 20	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador DFRD- F3	
	<400> 63 20	
55	gar aaygar g t nat haar cc	20
	<210> 64	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador DFRD- R3	
	<220>	
	<221 > base_modificada	
	<222> (7)..(7)	

<223> n(7) = i
 <400> 64 21
 rtrctnarr tgnacraayt g 21
 <210> 65
 5 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhDFR- F1
 10 <400> 65
 ggt cat gcaa aaggt cgggc agcgt aa 27
 <210> 66
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhDFR- F2
 <400> 66
 20 gt gat ct t ca cat ct t ccgc aggaacagt 29
 <210> 67
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador PhDFR- R4
 <400> 67
 atgattcatt aaaaat ccga aaaaagacc actacaa 37
 <210> 68
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhDFR- R3
 <400> 68
 35 aaccatgcat aat aaagcag at gt gt aaat 30
 <210> 69
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Art i f i c i a l
 40 <220>
 <223> Cebador PhDFR- F8A5
 <400> 69
 aaaaaat gga ggat gt gagg aagggt cct g tt 32
 <210> 70
 45 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhDFR- R5
 <400> 70
 50 acat gat t ca t t aaaaat cc gaaaaaaga cca 33
 <210> 71
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador ANS- dgF2
 <220>
 <221 > base_modificada
 60 <222> (2)..(26)
 <223> n(2,14,23,26) = i
 <400> 71
 t ncar ggbt a yggnagyarr ytnqcnrrmya 30
 <210> 72

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Cebador ANS- dgR2
 <220>
 <221 > base_modificada
 <222> (12)..(21)
 <223> n(12,15,21) = i
 10 <400> 72
 ggytrcara anaynrcca ngada 25
 <210> 73
 <211> 28
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhANS3RACEGSP1
 <400> 73
 20 gccacaccg acgt cagctc cctctcct 28
 <210> 74
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador PhAhS3RACEGSP2
 <400> 74
 cgt cggggat gcgct cgaga t cct cagc 28
 <210> 75
 <211> 28
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhANS5RACEGSP1
 <400> 75
 35 agt ccgcggg t t cagt cggc cagat ggt 28
 <210> 76
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Pr imer PhANS5RACEGSP2
 <400> 76
 ccgtcttc cggcggtag acgaggtg 28
 <210> 77
 45 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhANS init
 50 <400> 77
 atggccacca aagcaatccc acc 23
 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PhANS term
 <400> 78
 t caat ccaca ggcgct t ct 20
 60 <210> 79 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador GerF3H- F

ES 2 412 704 T3

	<400> 79	
	atgacgcctt t aacgct cct	20
	<210> 80	
	<211> 27	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador GerF3H- R	
	<400> 80	
10	ct agacct t a gtcgtctcat at acat g	27
	<210> 81 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador Ger DFR- F	
	<400> 81	
	at ggaagagg at t ct ccggc	20
	<210> 82 26	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Ger DFR- R	
	<400> 82	
25	ct at t ggcct tctttgaac aacaaa	26
	<210> 83 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Ger ANS- F	
30	<400> 83	
	atgggtgattc aagcaaccac a	21
	<210> 84	
	<211> 26	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Ger ANS- R	
	<400> 84	
40	ctagtttgc atcacttcgt ctttat	26
	<210> 85	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador Tor F3H1- F	
	<400> 85	
	atgagtcct tagccttgat gat	23
	<210> 86	
	<211> 23	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Tor F3H1- R	
	<400> 86	
55	ttaatagaca tgatggcca acc	23
	<210> 87	
	<211> 1539	
	<212> ADN	
	<213> Torenia fournieri	
60	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(1539)	
	<223> flavonoide 3'-hidroxilasa de Torenia fournieri	
	<400> 87	

ES 2 412 704 T3

atg	agt	ccc	tta	gcc	tig	atg	atc	cta	agt	acc	tta	tta	ggg	ttt	ctc	48
Met	Ser	Pro	Leu	Ala	Leu	Met	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	
1				5					10					15		
cta	tac	cac	tct	ctt	cgc	tta	cta	ctc	ttc	tcc	ggc	caa	ggt	cgc	cga	96
Leu	Tyr	His	Ser	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	Gly	Gln	Gly	Arg	Arg	
			20					25					30			
cta	cta	cca	cca	ggt	cca	cgg	ccg	tgg	ccg	ctg	gtg	gga	aac	ctc	ccg	144
Leu	Leu	Pro	Pro	Gly	Pro	Arg	Pro	Trp	Pro	Leu	Val	Gly	Asn	Leu	Pro	
		35					40					45				
cac	tta	ggc	ccg	aag	cca	cac	gcc	tcc	atg	gcc	gag	ctc	gcg	cga	gcc	192
His	Leu	Gly	Pro	Lys	Pro	His	Ala	Ser	Met	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Ala	
	50					55					60					
tac	gga	ccc	ctc	atg	cac	cta	aag	atg	gga	ttc	gta	cac	gtc	gtg	gtg	240
Tyr	Gly	Pro	Leu	Met	His	Leu	Lys	Met	Gly	Phe	Val	His	Val	Val	Val	
65				70						75					80	
gct	tcg	tcg	gcg	agc	gcg	gcg	gag	cag	tgc	ctg	agg	gtt	cac	gac	gcg	288
Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Glu	Gln	Cys	Leu	Arg	Val	His	Asp	Ala	
				85					90					95		

ES 2 412 704 T3

aat	ttc	ttg	agc	agg	cca	ccc	aac	tcc	ggc	gcc	aag	cac	gtc	gct	tac	336
Asn	Phe	Leu	Ser	Arg	Pro	Pro	Asn	Ser	Gly	Ala	Lys	His	Val	Ala	Tyr	
			100					105					110			
aac	tac	gag	gac	ttg	gtt	ttc	aga	ccg	tac	ggt	ccc	aag	tgg	agg	ctg	384
Asn	Tyr	Glu	Asp	Leu	Val	Phe	Arg	Pro	Tyr	Gly	Pro	Lys	Trp	Arg	Leu	
		115					120					125				
ttg	agg	aag	ata	tgc	gct	cag	cat	att	ttc	tcc	gtc	aag	gct	atg	gat	432
Leu	Arg	Lys	Ile	Cys	Ala	Gln	His	Ile	Phe	Ser	Val	Lys	Ala	Met	Asp	
	130					135					140					
gac	ttc	agg	cgc	gtc	aga	gag	gaa	gag	gtg	gcc	atc	ctg	agt	cgc	gct	480
Asp	Phe	Arg	Arg	Val	Arg	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Ala	
					150					155					160	
cta	gca	ggc	aaa	agg	gcg	gta	ccc	ata	ggc	caa	atg	ctc	aac	gtg	tgc	528
Leu	Ala	Gly	Lys	Arg	Ala	Val	Pro	Ile	Gly	Gln	Met	Leu	Asn	Val	Cys	
				165				170						175		
gcc	aca	aac	gcc	cta	tca	cgc	gtc	atg	atg	ggg	cgg	cgc	gtg	gtg	ggc	576
Ala	Thr	Asn	Ala	Leu	Ser	Arg	Val	Met	Met	Gly	Arg	Arg	Val	Val	Gly	
			180					185					190			
cac	gcg	gat	gga	acc	aac	gac	gcc	aag	gcg	gag	gag	ttc	aaa	gcc	atg	624
His	Ala	Asp	Gly	Thr	Asn	Asp	Ala	Lys	Ala	Glu	Glu	Phe	Lys	Ala	Met	
		195					200					205				
gtc	gtc	gag	ctc	atg	gtc	ctc	tcc	ggt	gtc	ttc	aac	atc	agt	gat	ttc	672
Val	Val	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Ser	Gly	Val	Phe	Asn	Ile	Ser	Asp	Phe	
	210					215					220					
atc	ccc	ttc	ctc	gag	cct	ctg	gac	ttg	cag	gga	gtg	gct	tcc	aag	atg	720
Ile	Pro	Phe	Leu	Glu	Pro	Leu	Asp	Leu	Gln	Gly	Val	Ala	Ser	Lys	Met	
	225				230					235					240	
aag	aaa	ctc	cac	gcg	cgg	ttc	gat	gca	ttc	ttg	acc	gag	att	gta	cga	768
Lys	Lys	Leu	His	Ala	Arg	Phe	Asp	Ala	Phe	Leu	Thr	Glu	Ile	Val	Arg	
			245					250						255		
gag	cgt	tgt	cat	ggg	cag	atc	aac	aac	ggt	ggt	gct	cat	cag	gat	gat	816
Glu	Arg	Cys	His	Gly	Gln	Ile	Asn	Asn	Gly	Gly	Ala	His	Gln	Asp	Asp	
			260					265					270			
ttg	ctt	agc	acg	ttg	att	tcg	ttc	aaa	ggg	ctt	gac	gat	ggc	gat	ggt	864
Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Ile	Ser	Phe	Lys	Gly	Leu	Asp	Asp	Gly	Asp	Gly	
		275					280					285				
tcc	agg	ctc	act	gac	aca	gaa	atc	aag	gcg	ctg	ctc	ttg	aac	ctt	ttt	912
Ser	Arg	Leu	Thr	Asp	Thr	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Asn	Leu	Phe	
	290					295					300					
gct	gcg	gga	acg	gac	acg	acg	tcg	agc	acg	gtg	gaa	tgg	gcc	gta	gcc	960
Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Ala	
					310					315					320	
gaa	ctc	cta	cgc	cac	cct	aag	aca	tta	gcc	caa	gtc	cgg	caa	gag	ctc	1008
Glu	Leu	Leu	Arg	His	Pro	Lys	Thr	Leu	Ala	Gln	Val	Arg	Gln	Glu	Leu	
				325					330					335		
gac	tcg	gtc	gtg	ggt	aag	aac	agg	ctc	gtc	tcc	gag	acc	gat	ctg	aat	1056
Asp	Ser	Val	Val	Gly	Lys	Asn	Arg	Leu	Val	Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Asn	
			340					345					350			
cag	ctg	ccc	tat	cta	caa	gct	gtc	gtc	aaa	gaa	act	ttc	cgc	ctc	cat	1104
Gln	Leu	Pro	Tyr	Leu	Gln	Ala	Val	Val	Lys	Glu	Thr	Phe	Arg	Leu	His	
		355				360						365				
cct	ccg	acg	ccg	ctc	tct	cta	ccg	aga	ctc	gcg	gaa	gat	gat	tgc	gag	1152

ES 2 412 704 T3

Pro Pro Thr Pro Leu Ser Leu Pro Arg Leu Ala Glu Asp Asp Oys Glu
 370 375 380

atc gac gga tac ctc atc ccc aag ggc tcc acc ctt ctg gtg aac gtt 1200
 lle Asp Gy Tyr Leu lle Pro Lys Gy Ser Thr Leu Leu Val Asn Val
 385 390 395 400

tgg gcc ata gcc cgc gat ccc aag gtt tgg gcc gat ccg ttg gag ttt 1248
 Trp Ala lle Ala Arg Asp Pro Lys Val Trp Ala Asp Pro Leu Gu Phe
 410 415

agg ccc gaa cga ttc ttg acg ggc gga gaa aag gcc gac gtc gat gtc 1296
 Arg Pro Gu Arg Phe Leu Thr Gy Gy Gu Lys Ala Asp Val Asp Val
 420 425 430

aag ggg aac gat ttc gaa ctg ata ccg ttc ggg gcg ggt cgt agg atc 1344
 Lys Gy Asn Asp Phe Gu Leu lle Pro Phe Gy Ala Gy Arg Arg lle
 435 440 445

tgc gcc ggc gtt ggc ttg gga ata cgt atg gtc caa ctg ttg acg gcg 1392
 Oys Ala Gy Val Gy Leu Gy lle Arg Met Val Gn Leu Leu Thr Ala
 450 455 460

agt ttg atc cat gca ttc gat ctg gac ctt gct aat ggg ctt ttg ccc 1440
 Ser Leu lle His Ala Phe Asp Leu Asp Leu Ala Asn Gy Leu Leu Pro
 465 470 475 480

caa aat ctg aac atg gaa gaa gca tat ggg ctt acg cta caa cgg gct 1488
 Gn Asn Leu Asn Met Gu Gu Ala Tyr Gy Leu Thr Leu Gn Arg Ala
 485 490 495

gag cct ttg ttg gtc cac cct agg ctg cgg ttg gcc act cat gtc tat 1536
 Gu Pro Leu Leu Val His Pro Arg Leu Arg Leu Ala Thr His Val Tyr
 500 510

t aa 1539
 <210> 88
 <211> 512
 <212> PRT
 5 <213> Torenia fournieri
 <400> 88
 Met Ser Pro Leu Ala Leu Met lle Leu Ser Thr Leu Leu Gy Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Tyr His Ser Leu Arg Leu Leu Leu Phe Ser Gy Gn Gy Arg Arg
 20 25 30

Leu Leu Pro Pro Gy Pro Arg Pro Trp Pro Leu Val Gy Asn Leu Pro
 35 40 45

His Leu Gy Pro Lys Pro His Ala Ser Met Ala Gu Leu Ala Arg Ala
 50 55 60

Tyr Gy Pro Leu Met His Leu Lys Met Gy Phe Val His Val Val Val
 65 70 75 80

Ala Ser Ser Ala Ser Ala Ala Gu Gn Cys Leu Arg Val His Asp Ala
 85 90 95

ES 2 412 704 T3

Asn Phe Leu Ser 100 Arg Pro Pro Asn Ser 105 Gly Ala Lys His Val 110 Ala Tyr
 Asn Tyr Glu 115 Asp Leu Val Phe Arg 120 Pro Tyr Gly Pro Lys 125 Trp Arg Leu
 Leu Arg 130 Lys Ile Cys Ala Glu 135 His Ile Phe Ser Val 140 Lys Ala Met Asp
 Asp Phe Arg Arg Val Arg 150 Glu Glu Glu Val Ala 155 Ile Leu Ser Arg Ala 160
 Leu Ala Gly Lys Arg 165 Ala Val Pro Ile Gly 170 Glu Met Leu Asn Val 175 Cys
 Ala Thr Asn Ala 180 Leu Ser Arg Val Met 185 Met Gly Arg Arg Val 190 Val Gly
 His Ala Asp 195 Gly Thr Asn Asp Ala 200 Lys Ala Glu Glu Phe 205 Lys Ala Met
 Val Val 210 Glu Leu Met Val Leu 215 Ser Gly Val Phe Asn 220 Ile Ser Asp Phe
 Ile Pro Phe Leu Glu Pro 230 Leu Asp Leu Glu Gly 235 Val Ala Ser Lys Met 240
 Lys Lys Leu His Ala 245 Arg Phe Asp Ala Phe 250 Leu Thr Glu Ile Val 255 Arg
 Glu Arg Cys His 260 Gly Glu Ile Asn Asn 265 Gly Gly Ala His Glu 270 Asp Asp
 Leu Leu Ser 275 Thr Leu Ile Ser Phe 280 Lys Gly Leu Asp Asp 285 Gly Asp Gly
 Ser Arg 290 Leu Thr Asp Thr Glu 295 Ile Lys Ala Leu Leu 300 Leu Asn Leu Phe
 Ala Ala Gly Thr Asp Thr Thr Ser Ser Thr Val 315 Glu Trp Ala Val Ala 320
 Glu Leu Leu Arg His 325 Pro Lys Thr Leu Ala 330 Glu Val Arg Glu Glu 335 Leu
 Asp Ser Val Val 340 Gly Lys Asn Arg Leu 345 Val Ser Glu Thr Asp 350 Leu Asn
 Glu Leu Pro 355 Tyr Leu Glu Ala Val 360 Val Lys Glu Thr Phe Arg Leu His
 Pro Pro Thr Pro Leu Ser Leu Pro Arg Leu Ala Glu Asp Asp Cys Glu

ES 2 412 704 T3

370

375

380

I l e A s p G l y T y r L e u I l e P r o L y s G l y S e r T h r L e u L e u V a l A s n V a l
385 390 395 400

T r p A l a I l e A l a A r g A s p P r o L y s V a l T r p A l a A s p P r o L e u G l u P h e
405 410 415

A r g P r o G l u A r g P h e L e u T h r G l y G l y G l u L y s A l a A s p V a l A s p V a l
420 425 430

L y s G l y A s n A s p P h e G l u L e u I l e P r o P h e G l y A l a G l y A r g A r g I l e
435 440 445

C y s A l a G l y V a l G l y L e u G l y I l e A r g M e t V a l G l n L e u L e u T h r A l a
450 455 460

S e r L e u I l e H i s A l a P h e A s p L e u A s p L e u A l a A s n G l y L e u L e u P r o
465 470 475 480

G l n A s n L e u A s n M e t G l u G l u A l a T y r G l y L e u T h r L e u G l n A r g A l a
485 490 495

G l u P r o L e u L e u V a l H i s P r o A r g L e u A r g L e u A l a T h r H i s V a l T y r
500 505 510

<210> 89 24

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cebador Tor DFR- F

<400> 89

at gagcat gg aagt agt acca 24

<210> 90 25

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador Tor DFR- R

<400> 90

15 ctattctatc ttatgttctcc catgg 25

<210> 91

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Cebador At FT 2nd- F

<400> 91

gaaaccacct gttgttcaa ga 22

<210> 92

25 <211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador At FT 2nd- R

30 <400> 92

tcaattggtt at aaaggaag aagc 24

<210> 93

<211> 28

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador PhF3dH- 367F

<400> 93

ES 2 412 704 T3

	cggtgcgagg tggcgtatgc tgaggcgt	28
	<210> 94	
	<211> 28	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PhF3dH- 394R	
	<400> 94	
10	acgcctcagc atacgccacc ggcaccg	28
	<210> 95	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador PhF3dH- R7G12	
	<400> 95	
	cacccttgc ataaattat gacat caagc	30
	<210> 96	
	<211> 36	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PhCH3- 1038F	
	<400> 96	
25	gt aacat gtc gagcgctgc gttctttca t act cg	36
	<210> 97	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador PhCHS3- 1073R	
	<400> 97	
	cgagt at gaa aagaacgcaa gcgct cgaca t gt t ac	36
35		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una orquídea polilla que tiene un color de flor modificado, que comprende transfectar una orquídea polilla con un gen que codifica una flavanona 3-hidroxisilasa, un gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa, un gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa de *Gerbera* o *Torenia* y un gen que codifica una antocianidina sintasa y expresar los genes.
- 10 2. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa deriva de una orquídea polilla o *Gerbera*.
3. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 1 o 3.
- 15 4. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 5 o 7.
5. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el gen que codifica una flavonona 3-hidroxisilasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 9.
- 20 6. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el gen que codifica una antocianidina sintasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 11 o 13.
7. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 1 o 3, y el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 5 o 7.
- 25 8. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el gen que codifica una flavonona 3-hidroxisilasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 9; y el gen que codifica una antocianidina sintasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 11 o 13.
- 30 9. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el gen que codifica una flavonona 3-hidroxisilasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 9, el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 1 o 3, el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 5 o 7, y el gen que codifica una antocianidina sintasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 11 o 13.
- 35 10. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el gen que codifica una flavonona 3-hidroxisilasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 9, el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 1, el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 5, y el gen que codifica una antocianidina sintasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 11 o 13.
- 40 11. Una orquídea polilla que tiene un color de la flor modificado, transfectando dicha orquídea con un gen que codifica una flavanona 3-hidroxisilasa, un gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa, un gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa de *Gerbera* o *Torenia* y un gen que codifica una antocianidina sintasa y expresando los genes; una progenie que tiene los mismos caracteres que el color de la flor modificado, o su tejido.
- 45 12. La orquídea polilla de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el gen que codifica una flavonoide 3'-hidroxilasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 1 o 3.
- 50 13. La orquídea polilla de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 5 o 7.
14. La orquídea polilla de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el gen que codifica una flavanona 3-hidroxisilasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEC ID NO: 9.
- 55 15. La orquídea polilla de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el gen que codifica una antocianidina sintasa tiene una secuencia de ADN representada por el SEQ ID NO: 11 o 13.

Fig. 1

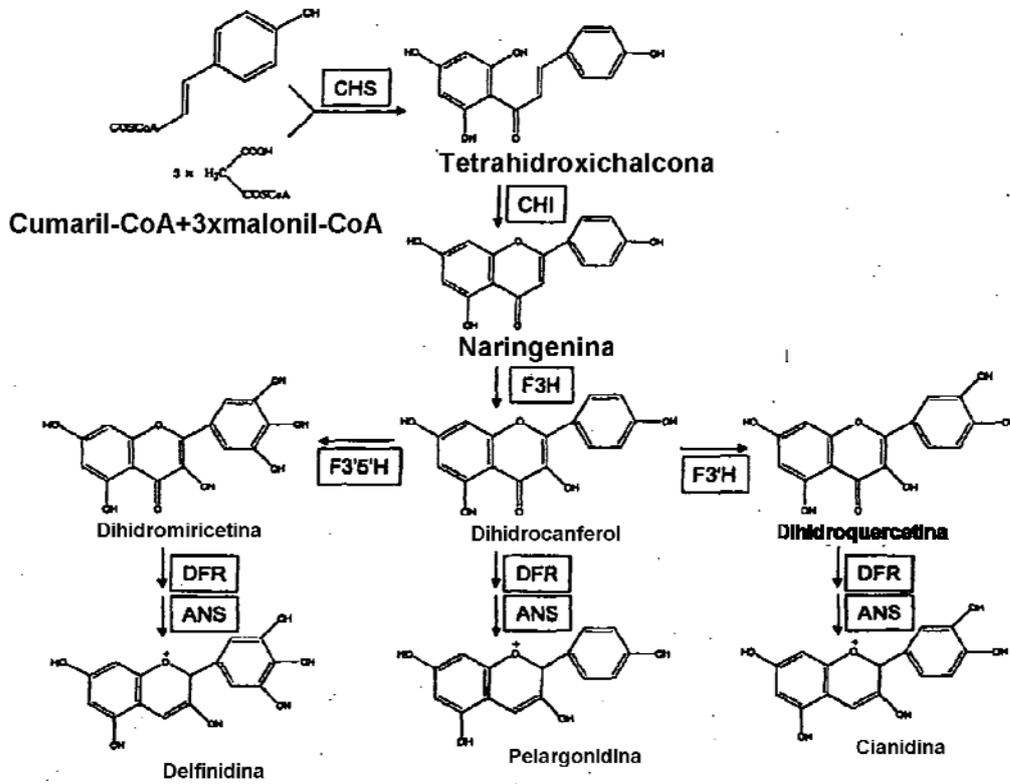


Fig. 2

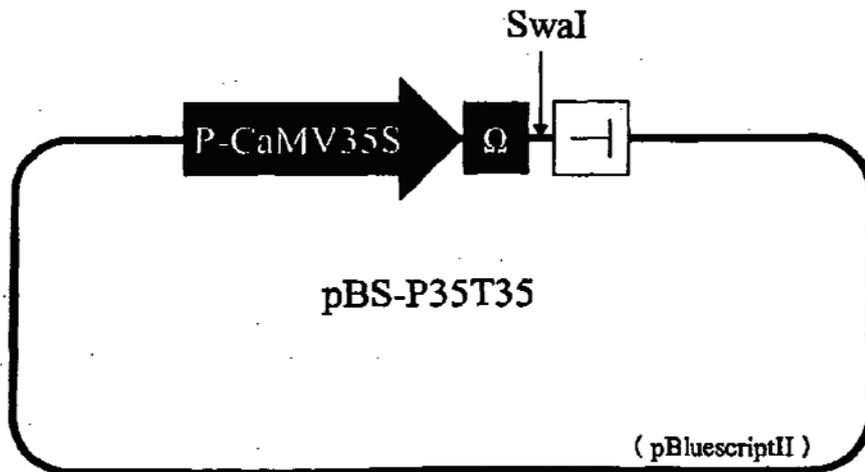


Fig. 3

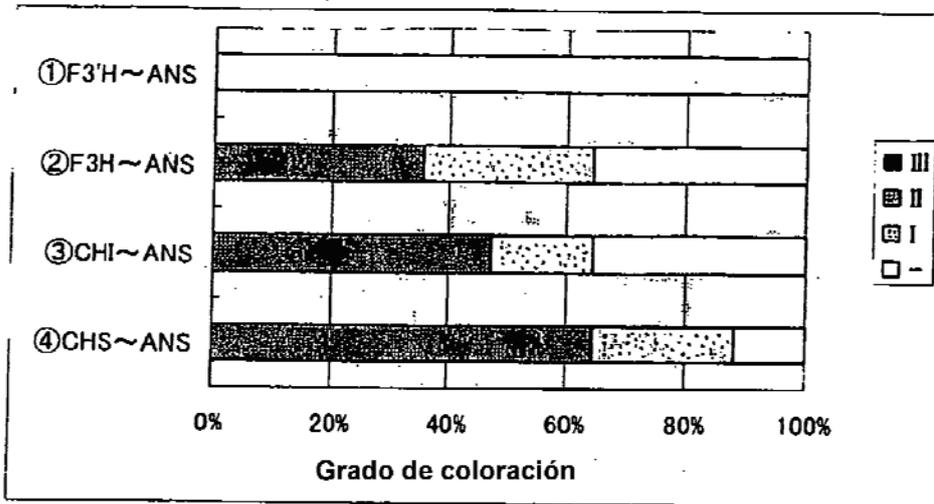


Fig. 4

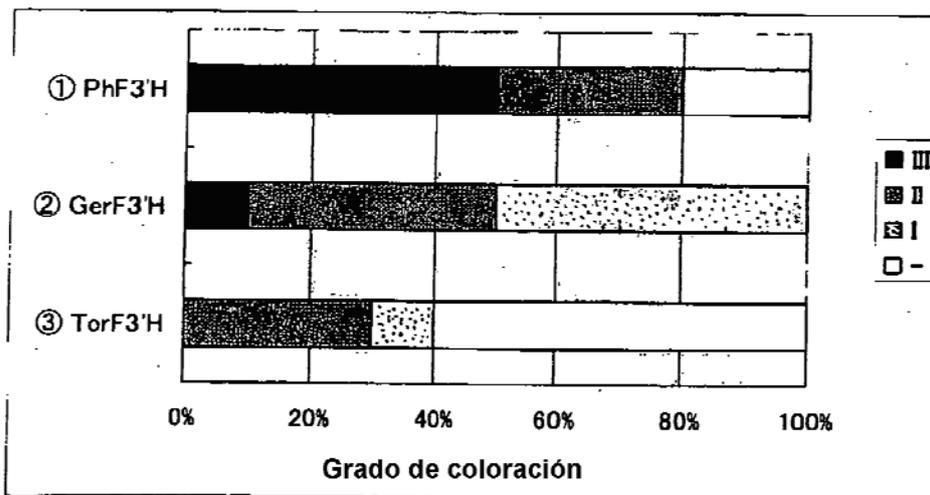


Fig. 5

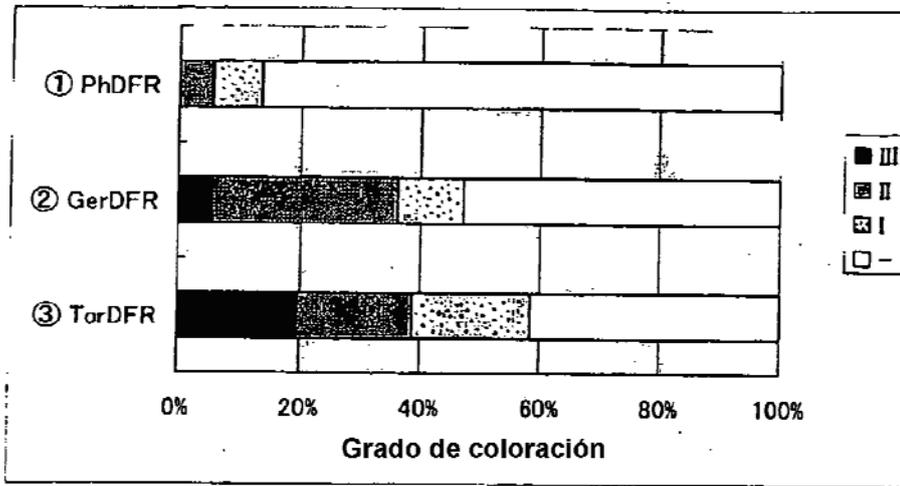


Fig. 6

