

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 737**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2003 E 10182674 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 2292764**

54 Título: **Secuencias genéticas de flavonoide 3',5'-hidroxilasa y usos para las mismas**

30 Prioridad:

30.08.2002 AU 2002951088
16.09.2002 AU 2002952835

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2013

73 Titular/es:

SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40, Dojimahama 2-chome Kita-ku, Osaka-shi
Osaka 530-8203, JP

72 Inventor/es:

BRUGLIERA, FILIPPA;
TANAKA, YOSHIKAZU y
MASON, JOHN

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 435 737 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

Secuencias genéticas de flavonoide 3',5'-hidroxilasa y usos para las mismas

5 **Antecedentes de la invención**Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a promotores que operan eficientemente en rosales y pueden también operar en plantas tales como gerbera o plantas botánicamente relacionadas. También se desvela una secuencia genética que codifica un polipéptido que tiene actividad de flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) y el uso de la secuencia genética y/o sus correspondientes polipéptidos, entre otros, para manipular el color en las flores o partes de las mismas o en otros tejidos de plantas. El F3'5'H tiene la capacidad de modular el metabolismo del dihidrocanferol (DHK), además del metabolismo de otros sustratos tales como dihidroquercetina (DHQ), naringenina y eriodictol. También se desvela una secuencia genética que codifica un polipéptido que tiene actividad de F3'5'H cuando se expresa en rosa o gerbera o plantas botánicamente relacionadas. En el presente documento también se desvelan moléculas antisentido y sentido o moléculas inductoras de ARNi correspondientes a toda o parte de la secuencia genética anteriormente mencionada o un transcrito de la misma, además de plantas genéticamente modificadas, flores cortadas, partes y tejido reproductivo de tales plantas.

20 Descripción de técnica anterior

Referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no debe tomarse como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forme parte del conocimiento general común en cualquier país.

Los detalles bibliográficos de las referencias proporcionadas en la memoria descriptiva objeto se enumeran al final de la memoria descriptiva.

30 La industria de las flores o las plantas ornamentales procura desarrollar nuevas y diferentes variedades de flores y/o plantas. Una manera eficaz de crear tales variedades novedosas es a través de la manipulación del color de las flores. Las técnicas de cruce clásicas han sido utilizadas con algún éxito para producir una amplia gama de colores de casi todas las variedades comerciales de flores y/o plantas disponibles hoy en día. Sin embargo, esta metodología ha estado limitada por las restricciones de un conjunto de gens de especies particular y por esta razón es raro que una especie individual tenga el espectro completo de variedades coloreadas. Por ejemplo, el desarrollo de variedades coloreadas novedosas de plantas o partes de plantas tales como flores, follaje y tallos ofrecería una oportunidad significativa tanto a los mercados de flor cortada como a los ornamentales. En la industria de las flores o las plantas ornamentales, el desarrollo de variedades coloreadas novedosas de especies de florecimiento importantes tales como rosa, crisantemo, tulipán, lirio, clavel, gerbera, orquídea, lisianthus, begonia, torenia, geranio, petunia, nierembergia, pelargonio, iris, impatiens y ciclamen sería de gran interés. Un ejemplo más específico sería el desarrollo de una rosa o gerbera azul para el mercado de flor cortada.

45 Además, el desarrollo de novedosas variedades coloreadas de partes de plantas tales como verduras, frutos y semillas ofrecería oportunidades significativas en la agricultura. Por ejemplo, semillas coloreadas novedosas serían útiles como marcas de propiedad para plantas. Modificaciones adicionales a flavonoides comunes a bayas o frutos que incluyen uvas y manzanas y sus zumos, incluyendo el vino, tendrían la posibilidad de conferir características de estilo alteradas de valor a tales industrias de los frutos y de subproductos.

50 El color de las flores es predominantemente debido a tres tipos de pigmento: flavonoides, carotenoides y betalainas. De los tres, los flavonoides son los más comunes y contribuyen a una amplia gama de colores desde el amarillo hasta el rojo y hasta el azul. Las moléculas de flavonoides que hacen la principal contribución al color de las flores son las antocianinas, que son derivados glucosilados de cianidina y su derivado metilado peonidina, *moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina* y sus derivados metilados petunidina y malvidina y pelargonidina. Las antocianinas están localizadas en la vacuola de las células epidérmicas de los pétalos o en la vacuola de las células subepidérmicas de las hojas.

60 Los pigmentos flavonoides son metabolitos secundarios de la ruta fenilpropanoide. La ruta biosintética de los pigmentos flavonoides (ruta de los flavonoides) está bien establecida (Holton y Cornish, *Plant Cell* 7: 1071-1083, 1995; Mol y col., *Trends Plant Sci.* 3: 212-217, 1998; Winkel-Shirley, *Plant Physiol.* 126: 485-493, 2001a; y Winkel-Shirley, *Plant Physiol.* 127: 1399-1404, 2001b) y se muestra en las Figuras 1A y B. Tres reacciones y enzimas participan en la conversión de la fenilalanina a *p*-cumaroil-CoA, uno de los primeros sustratos clave en la ruta de los flavonoides. Las enzimas son fenilalanina amonio-liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y 4-cumarato: CoA ligasa (4CL). La primera etapa comprometida en la ruta implica la condensación de tres moléculas de malonil-CoA (proporcionada por la acción de la acetil CoA carboxilasa (ACC) sobre acetil CoA y CO₂) con una molécula de *p*-cumaroil-CoA. Esta reacción es catalizada por la enzima chalcona sintasa (CHS). El producto de esta relación, la 2',4,4',6'-tetrahidroxi-chalcona, normalmente se isomeriza de manera muy rápida por la enzima chalcona flavanona

isomerasa (CHI) para producir naringenina. La naringenina se hidroxila posteriormente en la posición 3 del anillo central por la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) para producir dihidrocanferol (DHK).

El patrón de hidroxilación del anillo B del dihidrocanferol (DHK) desempeña una función clave en la determinación del color de los pétalos. El anillo B puede hidroxilarse en o bien la posición 3', o en tanto las posiciones 3' como 5', para producir dihidroquercetina (DHQ) o dihidromiricetina (DHM), respectivamente. Dos enzimas clave implicadas en esta parte de la ruta son flavonoide 3'-hidroxilasa y flavonoide 3',5'-hidroxilasa, ambas de la clase de citocromo P450 de las enzimas. Las enzimas citocromo P450 tienen amplia distribución en la naturaleza y se han aislado y secuenciado genes a partir de vertebrados, insectos, levaduras, hongos, bacterias y plantas.

La flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) es una enzima clave en la ruta de los flavonoides que conduce a los pigmentos basados en cianidina que, en muchas especies vegetales (por ejemplo, *Rosa spp.*, *Dianthus spp.*, *Petunia spp.*, begonia, ciclamen, impatiens, gloria de la mañana y crisantemo) contribuyen al color rojo y rosa de las flores.

La flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) es una enzima clave en la ruta de los flavonoides que conduce a los pigmentos basados en delfinidina que, en muchas especies de plantas (por ejemplo, *Petunia spp.*, *Viola spp.*, *Lisianthus spp.*, *Gentiana spp.*, *Sollya spp.*, *Salvia spp.*, *Clitoria spp.*, *Kennedia spp.*, *Campanula spp.*, *Lavandula spp.*, *Verbena spp.*, *Torenia spp.*, *Delphinium spp.*, *Solanum spp.*, *Cineraria spp.*, *Vitis spp.*, *Babiana stricta*, *Pinus spp.*, *Picea spp.*, *Larix spp.*, *Phaseolus spp.*, *Vaccinium spp.*, *Cyclamen spp.*, *Iris spp.*, *Pelargonium sp.*, *Liparieae*, *Geranium spp.*, *Pisum spp.*, *Lathyrus spp.*, *Catharanthus spp.*, *Malvia spp.*, *Mucuna spp.*, *Vicia spp.*, *Saintpaulia spp.*, *Lagerstroemia spp.*, *bouchina spp.*, *Plumbago spp.*, *Hypocalyptus spp.*, *Rhododendron spp.*, *Linum spp.*, *Macropitilium spp.*, *Hibiscus spp.*, *Hydrangea spp.*, *Cymbidium spp.*, *Millettia spp.*, *Hedysarum spp.*, *Lespedeza spp.*, *Asparagus spp.*, *Antigonon spp.*, *Pisum spp.*, *Freesia spp.*, *Brunella spp.*, *Clarkia spp.*, etc.) contribuyen al color púrpura y azul de las flores. Muchas especies tales como rosas, gerberas, crisantemos y claveles no producen pigmentos basados en delfinidina debido a que carecen de una actividad de F3'5'H.

La siguiente etapa en la ruta, que conduce a la producción de las antocianinas coloreadas a partir de los dihidroflavonoides (DHK, DHQ, DHM) implica dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) que conduce a la producción de las leucoantocianidinas. Las leucoantocianidinas se convierten posteriormente en antocianidinas, pelargonidina, cianidina y moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina. Estas moléculas de flavonoide son inestables bajo condiciones fisiológicas normales y la glucosilación en la posición 3, mediante la acción de las glucosiltransferasas, estabiliza la molécula de antocianidina permitiendo así la acumulación de las antocianinas. En general, las glucosiltransferasas transfieren los restos azúcar de los azúcares UDP a las moléculas de flavonoide y muestran altas especificidades de la posición de glucosilación y especificidades relativamente bajas para los sustratos aceptores (Seitz y Hinderer, *Anthocyanins*. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Constabel, F. y Vasil, I.K. (eds.), Academic Press, Nueva York, EE.UU., 5: 49-76, 1988). Las antocianinas pueden presentarse como 3-monósidos, 3-biósidos y 3-triósidos, además de cómo 3,5-diglucósidos y 3,7-diglucósidos asociados con los azúcares glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y xilosa (Strack y Wray, En: *The Flavonoids - Advances in Research since 1986*. Harborne, J.B. (ed), Chapman and Hall, Londres, RU, 1-22, 1993).

Las glucosiltransferasas implicadas en la estabilización de la molécula de antocianidina incluyen UDP glucosa: flavonoide 3-glucosil transferasa (3GT), que transfiere un resto de glucosa de la UDP glucosa a la posición 3-O de la molécula de antocianidina para producir antocianidina 3-O-glucósido.

En la petunia y el pensamiento (entre otras), la antocianidina 3-O-glucósido está en general glucosilada por otra glucosiltransferasa, la UDP ramnosa: antocianidin 3-glucosido ramnosiltransferasa (3RT), que añade un grupo ramnosa a la glucosa unida a 3-O de la molécula de antocianina para producir los antocianidin 3-rutinosidos y una vez acilados, pueden modificarse adicionalmente por la UDP glucosa: antocianin 5-glucosiltransferasa (5GT). Sin embargo, en rosas (entre otras), los antocianidin 3-O-glucósidos son generalmente glucosilados por otra glucosiltransferasa, la UDP glucosa antocianin 5-glucosiltransferasa (5GT) para producir antocianidin 3,5-diglucósidos.

Muchos antocianidin glucósidos existen en forma de derivados acilados. Los grupos acilo que modifican los antocianidin glucósidos pueden dividirse en dos clases principales basándose en su estructura. Los grupos acilo alifáticos incluyen ácido malónico o ácido succínico y la clase aromática incluye ácidos hidroxicinámicos tales como ácido p-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico y los ácidos benzoicos tales como ácido p-hidroxibenzoico.

También puede producirse metilación en las posiciones 3' y 5' del anillo B de los antocianidin glucósidos. La metilación de los pigmentos basados en cianidina conduce a la producción de peonidina. La metilación de la posición 3' de los pigmentos basados en delfinidina produce la producción de petunidina, mientras que la metilación en las posiciones 3' y 5' produce la producción de malvidina. La metilación de la malvidina también puede producirse en las posiciones 5-O y 7-O para producir capensinina (5-O-metil malvidina) y 5,7-di-O-metil malvidina.

Además de las modificaciones anteriores, el pH de la vacuola o compartimento donde los pigmentos están localizados y la copigmentación con otros flavonoides tales como flavonoles y flavonas puede afectar el color del pétalo. Los flavonoles y las flavonas pueden también acilarse aromáticamente (Brouillard y Dangles, en: *The*

Flavonoids - Advances in Research since 1986. Harborne, J.B. (ed), Chapman y Hall, Londres, RU, 1-22, 1993).

La capacidad para controlar la actividad de F3'5'H, u otras enzimas que participan en la ruta de los flavonoides, en plantas de floración proporcionaría un medio de manipulación del color de partes de plantas tales como pétalos, frutos, hojas, sépalos, semillas etc. Así podrían generarse diferentes versiones coloreadas de un único cultivar y en algunos casos una especie individual podría ser capaz de producir un espectro más amplio de colores.

Se han clonado dos secuencias de nucleótidos (denominadas aquí como SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3) que codifican F3'5'H de petunia (véase la solicitud de patente internacional nº PCT/AU92/00334 y Holton y col., *Nature*, 366: 276-279, 1993a). Estas secuencias fueron eficaces en la modulación de la 3',5' hidroxilación de flavonoides en petunia (véase la solicitud de patente internacional nº PCT/AU 92/00334 y Holton y col., 1993^a, arriba), tabaco (véase la solicitud de patente internacional nº PCT/AU92/00334) y claveles (véase la solicitud de patente internacional nº PCT/AU96/00296). Sorprendentemente, sin embargo, la inclusión de estas secuencias en casetes de expresión convencionales no condujo a la producción de transcriptos intactos o de longitud completa según se detecta por ARN o análisis de transferencia Northern y consecuentemente los flavonoides 3',5'-hidroxilados no se produjeron en rosas. Por lo tanto, existe una necesidad de identificar secuencias genéticas adicionales que codifiquen F3'5'H que se acumulen eficientemente y sean capaces de modular la 3',5'-hidroxilación de flavonoides tales como antocianinas en rosas y otras especies vegetales comerciales clave.

Sumario de la invención

En toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderán que implican la inclusión de un elemento establecido o número entero o grupo de elementos o números enteros, pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se denominan por un número identificador de secuencia (SEQ ID NO:). SEQ ID NOs: se corresponde numéricamente con los identificadores de secuencia <400>1 (SEQ ID NO:1), <400>2 (SEQ ID NO:2), etc.

La secuencia genéticas que codifican una F3'5'H han sido identificadas y clonadas a partir de varias especies vegetales. Las secuencias genéticas de F3'5'H cuando se expresan en tejido de pétalo de rosa producen un nivel detectable de delfinidina o moléculas basadas en delfinidina como se determina por una técnica cromatográfica tal como cromatografía en capa fina (CCF) o cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Alternativamente, o además, la expresión de las secuencias genéticas en tejido de pétalo de rosa producen un nivel suficiente y una longitud de transcrito que es capaz de ser traducida a F3'5'H. Esto se mide convenientemente como moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina, detectables utilizando una técnica cromatográfica tal como CCF o HPLC. Las secuencias genéticas descritas en el presente documento permiten la modulación de la expresión de genes que codifican esta enzima, por ejemplo, por de expresión *de novo*, expresión en exceso, supresión, inhibición antisentido, actividad de ribozimas, inducción por ARNi o inducción por metilación. La capacidad para controlar la síntesis de F3'5'H en plantas y más específicamente en rosas o gerberas permite la modulación de la composición de antocianinas individuales, además de la alteración de niveles relativos de flavonoles y antocianinas, permitiendo por lo tanto la manipulación del color de tejidos y/u órganos de plantas tales como pétalos, hojas, semillas, sépalos, frutos, etc.

Algunas de las moléculas de ácido nucleico codifican una F3'5'H que es capaz de una conversión más eficiente de DHK a DHM en rosas que lo que es la F3'5'H codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3 como se mide por la producción de delfinidina en pétalos de rosa.

La eficiencia como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de la enzima F3'5'H para convertir su sustrato DHK o DHQ en DHM en una célula de rosa (o cualquier célula de una planta comercialmente importante tal como gerbera). Esta conversión provee a la planta de un sustrato (DHM) para otras enzimas de la ruta de los flavonoides que están presentes en las plantas para modificar adicionalmente el sustrato. Esta modificación puede incluir, por ejemplo, glucosilación, acilación, ramnosilación y/o metilación para producir diversas antocianinas que contribuyen a la producción de una gama de colores. Así se permite la modulación de antocianinas 3',5'-hidroxiladas en rosa. La eficiencia se evalúa convenientemente por uno o más parámetros seleccionados de: grado de transcripción de F3'5'H, como se determina por la cantidad de ARNm de F3'5'H intacto producido (como se detecta por análisis de transferencia Northern); grado de traducción del ARNm de F3'5'H como se determina por la cantidad de producto de traducción producido; grado de actividad de la enzima F3'5'H como se determina por la producción de derivados de antocianina de DHQ o DHM que incluyen pigmentos de delfinidina o basados en delfinidina (como se detecta por CCF o HPLC); el grado de efecto sobre el color de la flor.

También se ha determinado sorprendentemente que ciertas combinaciones de secuencias de promotores y del gen *F3'5'H* que fueron funcionales en clavel y petunia no fueron funcionales en rosa. Sorprendentemente, solo un subconjunto particular de combinaciones de secuencias de promotores y del gen *F3'5'H* produjeron flavonoides 3',5'-hidroxilados en flores de rosa. Éstas incluyeron secuencias de *F3'5'H* aisladas de *Viola spp*, *Salvia spp*, *Lavandula*

spp, *Sollya spp*. Adicionalmente, las secuencias de *F3'5'H* de *Viola* (o *F3'5'H* de pensamiento) produjeron la acumulación más alta de flavonoides 3',5'-hidroxilados en rosa. Las novedosas combinaciones de secuencias de promotores y del gen *F3'5'H* pueden emplearse, entre otras cosas, para modular el color o sabor u otras características de plantas o partes de plantas tales como, pero no se limitan a, flores, frutos, frutos secos, raíces, tallos, hojas o semillas. Así, la presente invención representa uno nuevo enfoque para desarrollar variedades de plantas que tengan características de color alteradas. Otros usos incluyen, por ejemplo, la producción de novedosos extractos de plantas transformadas con *F3'5'H* en las que el extracto tiene uso, por ejemplo, como aromatizante o aditivos alimentarios o productos para la salud o bebida o zumo o colorante. Las bebidas pueden incluir, pero no se limitan a, vinos, bebidas espirituosas, tés, café, leche y productos lácteos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada para su uso como promotor que es operable en tejido de pétalo de rosa que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:30 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias con SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:30 o una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con al menos una de SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:30 o un complemento de las mismas bajo condiciones de alta rigurosidad.

Las secuencias de nucleótidos que codifican *F3'5'H* de pensamiento (SEQ ID NOs:9 y 11), *F3'5'H* de salvia (SEQ ID NOs:13 y 15), *F3'5'H* de *Sollya* (SEQ ID NO:17), *F3'5'H* de lavanda (SEQ ID NO:31) y *F3'5'H* de *Kennedia* (SEQ ID NO:26) se definen mediante identificadores de secuencia indicados en paréntesis. Un resumen de los identificadores de secuencia se muestra en la Tabla 1.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención proporciona la molécula de ácido nucleico de promotor anteriormente definida operativamente ligada a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (*F3'5'H*), en el que la secuencia de nucleótidos está seleccionada de SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:31 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias con SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:31 o una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con al menos una de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:31 o un complemento de las mismas bajo condiciones de alta rigurosidad, en el que la expresión de dicha molécula de ácido nucleico que codifica una *F3'5'H* en un tejido de pétalo produce niveles detectables de moléculas de *delfinidina* o basadas en *delfinidina* como se mide por una técnica cromatográfica.

Las secuencias de aminoácidos de las enzimas *F3'5'H* expuestas en SEQ ID NO:10 (pensamiento) o SEQ ID NO:12 (pensamiento) o SEQ ID NO:14 (salvia) o SEQ ID NO:16 (salvia) o SEQ ID NO:18 (*Sollya*) o SEQ ID NO:32 (lavanda) o SEQ ID NO:27 (*Kennedia*).

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método de producción de una planta que florece transgénica capaz de sintetizar una *F3'5'H*, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de promotor desvelada en las reivindicaciones operativamente ligada a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una *F3'5'H* como se ha definido en las reivindicaciones en condiciones que permitan la eventual expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La expresión de la secuencia de ácidos nucleicos generalmente produce una transcripción de nivel y longitud suficiente para codificar una *F3'5'H*. Esto se determina convenientemente mediante niveles detectables de moléculas de *delfinidina* o basadas en *delfinidina* como se mide por técnicas cromatográficas tales como CCF o HPLC. La planta transgénica puede por lo tanto producir una *F3'5'H* no indígena a niveles elevados con respecto a la cantidad expresada en una planta no transgénica comparable. Esto produce generalmente un cambio de color visualmente detectable en la planta o parte de la planta o preferiblemente en la florescencia o flores de dicha planta.

Otro aspecto de la presente invención contempla un método de producción de una planta transgénica con actividad de *F3'5'H* reducida, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de promotor desvelada en las reivindicaciones operativamente ligada a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica una actividad de *F3'5'H* como se define en las reivindicaciones, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cuando sea necesario cultivar dicha planta transgénica bajo condiciones suficientes para permitir la expresión del ácido nucleico.

Todavía otro aspecto de la presente invención contempla una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de promotor desvelada en las reivindicaciones operativamente ligada a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una *F3'5'H* como se define en las reivindicaciones o que comprende un nivel

alterado de expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una F3'5'H como se define en las reivindicaciones con respecto al nivel de expresión en una planta no genéticamente modificada, preferentemente en el que la planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma presentan flores o inflorescencia alteradas.

5 Todavía otro aspecto de la presente invención contempla el uso de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de promotor desvelada en las reivindicaciones operativamente ligada a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una F3'5'H como se define en las reivindicaciones en la fabricación de: (i) una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma; o (ii) una construcción genética que puede expresar F3'5'H o regular por disminución una enzima F3'5'H indígena en una planta.

15 Incluso todavía otro aspecto de la presente invención se extiende a todas las plantas transgénicas o partes de plantas transgénicas o progenie de las plantas transgénicas que contienen las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención como se define en las reivindicaciones, o formas antisentido de las mismas y/o cualquier homólogo o formas relacionadas de las mismas como se define en las reivindicaciones y, en particular, aquellas plantas transgénicas que presentan propiedades florales o de inflorescencia alteradas.

20 Incluso todavía otro aspecto de la presente invención se extiende a todas las plantas transgénicas o partes de plantas transgénicas o progenie de las plantas transgénicas que contienen las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención como se define en las reivindicaciones, o formas antisentido de las mismas y/o cualquier homólogo o forma relacionada de las mismas como se define en las reivindicaciones y, en particular, aquellas plantas transgénicas que presentan partes aéreas alteradas de la planta tal como propiedades de fruto, bayas, sépalo, bráctea, pecíolo, pedúnculo, ovario, anteras o tallo.

25 Otro aspecto de la presente invención contempla los extractos de las flores de plantas transgénicas o partes de las mismas o células como se definen en las reivindicaciones y, en particular, los extractos de las flores de aquellas plantas transgénicas cuando se usan como aromatizante o aditivo alimentario o producto para la salud o bebida o zumo o colorante.

30 Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un organismo procarionta o eucariota no humano que lleva una secuencia genética que codifica una F3'5'H como se define en las reivindicaciones extracromosómicamente en forma de plásmido.

35 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones en la identificación o amplificación y clonación de material genético que codifica una F3'5'H.

40 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones en la identificación o amplificación y clonación de material genético que define un promotor de chalcona sintasa.

45 Así, la presente invención proporciona promotores que operan eficientemente en plantas tales como rosa y gerbera o plantas botánicamente relacionadas. Tales promotores incluyen un promotor *CHS* de rosa y un promotor *CHS* de crisantemo. También se desvela el promotor *CaMV 35S*.

Un resumen de identificadores de secuencia usados en toda la memoria descriptiva objeto se proporciona en la Tabla 1:

TABLA 1: Resumen de identificadores de secuencia

SEQ ID NO:	NOMBRE	ESPECIE	TIPO DE SEQ	DESCRIPCIÓN
1	<i>petHf1.nt</i>	<i>Petunia hybrida</i>	nucleótido	<i>ADNc de F3'5'H</i>
2	<i>petHf1.aa</i>	<i>Petunia hybrida</i>	aminoácido	<i>traducción de ADNc de F3'5'H</i>
3	<i>petHf2.nt</i>	<i>Petunia hybrida</i>	nucleótido	<i>ADNc de F3'5'H</i>
4	<i>petHf2.aa</i>	<i>Petunia hybrida</i>	aminoácido	<i>traducción de ADNc de F3'5'H</i>
5	promotor <i>RoseCHS</i>	<i>Rosa hybrida</i>	nucleótido	<i>fragmento de promotor</i>
6	D8 oligo#2	<i>Petunia hybrida</i>	nucleótido	<i>oligonucleótido</i>
7	D8 oligo #4	<i>Petunia hybrida</i>	nucleótido	<i>oligonucleótido</i>
8	chrysanCHSATG	crisantemo	nucleótido	<i>oligonucleótido</i>
9	<i>BP#18.nt</i>	<i>Viola spp.</i>	nucleótido	<i>ADNc de F3'5'H</i>

10	BP#18.aa	<i>Viola spp.</i>	aminoácido	traducción de ADNc de F3'5'H
11	BP#40.nt	<i>Viola spp.</i>	nucleótido	ADNc de F3'5'H
12	BP#40.aa	<i>Viola spp.</i>	aminoácido	traducción de ADNc de F3'5'H
13	Sal#2.nt	<i>Salvia spp.</i>	nucleótido	ADNc de F3'5'H
14	Sal#2.aa	<i>Salvia spp.</i>	aminoácido	traducción de ADNc de F3'5'H
15	Sal#47.nt	<i>Salvia spp.</i>	nucleótido	ADNc de F3'5'H
16	Sal#47.aa	<i>Salvia spp.</i>	aminoácido	traducción de ADNc de F3'5'H
17	Soll#5.nt	<i>Sollya spp.</i>	nucleótido	ADNc de F3'5'H
18	Soll#5.aa	<i>Sollya spp.</i>	aminoácido	traducción de ADNc de F3'5'H
19	FLS-Nco	<i>Petunia hybrida</i>	nucleótido	oligonucleótido
20	BpeaHF2.nt	<i>Clitoria ternatea</i>	nucleótido	ADNc de F3'5'H
21	BpeaHF2.aa	<i>Clitoria ternatea</i>	aminoácido	traducción de ADNc de F3'5'H
22	Gen#48.nt	<i>Gentiana triflora</i>	nucleótido	ADNc de F3'5'H
23	Gen#48.aa	<i>Gentiana triflora</i>	aminoácido	traducción de ADNc de F3'5'H
24	PetD8 5'	<i>Petunia hybrida</i>	nucleótido	oligonucleótido
25	Cebador de Bpea	<i>Clitoria ternatea</i>	nucleótido	oligonucleótido
26	Kenn#31.nt	<i>Kennedia spp.</i>	nucleótido	ADNc de F3'5'H
27	Kenn#31.aa	<i>Kennedia spp.</i>	aminoácido	traducción de ADNc de F3'5'H
28	chrysCHS.nt	crisantemo	nucleótido	ADNc de CHS
29	chrysCHS.aa	crisantemo	aminoácido	traducción de ADNc de CHS
30	Promotor de chrysCHS	crisantemo	nucleótido	fragmento de promotor
31	LBG.nt	<i>Lavandula nil</i>	nucleótido	ADNc de F3'5'H
32	LBG.aa	<i>Lavandula nil</i>	aminoácido	traducción de ADNc de F3'5'H

Breve descripción de las figuras

- 5 Las Figuras 1A y 1B son representaciones esquemáticas de la ruta de biosíntesis para los pigmentos flavonoides. La Figura 1A ilustra la producción general de antocianidin 3-glucósidos que se producen en la mayoría de las plantas que producen antocianinas. La Figura 1B representa modificaciones adicionales de las antocianinas que se producen en petunia. Las enzimas que participan en la ruta se indican como sigue: PAL = Fenilalanina amonio-liasas; C4H = Cinamato 4-hidroxilasa; 4CL = 4-cumarato: CoA ligasa; CHS = Chalcona sintasa, CHI = Chalcona flavanona isomerasa; F3H = Flavanona 3-hidroxilasa; DFR = Dihidroflavonol-4-reductasa; ANS = antocianidin sintasa, 3GT = UDP-glucosa: flavonoide 3-O-glucosiltransferasa; 3RT = UDP ramnosa: antocianidin 3-glucósido ramnosiltransferasa, AR-AT = Antocianidin rutinósido-aciltransferasa, 5GT = Antocianin 5-glucosiltransferasa; 3'OMT = Antocianin 3'-O-metiltransferasa, 3'5' OMT = Antocianin 3',5'-O-metiltransferasa. Otras abreviaturas incluyen: DHK = dihidrocanferol, DHQ = dihidroquercetina, DHM = dihidromircetina;
- 15 TABLA 2: Descripciones de las abreviaturas usadas en las Figuras 2 a 52

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
Amp	gen de resistencia a la ampicilina que confiere resistencia al antibiótico ampicilina
ColEori	origen de replicación de plásmido
f1 ori (+)	origen de replicación de fago filamentoso f1
GentR	gen de resistencia a la gentamicina que confiere resistencia al antibiótico gentamicina
LB	frontera izquierda del ADN-T
<i>nptIII</i>	el gen neomicina fosfotransferasa III que confiere resistencia al antibiótico kanamicina
ori pRi	origen de replicación de plásmido
ori 322	origen de replicación de plásmido

pACYC ori	replicón modificado de pACYC184 de <i>E. coli</i>
pVS1	un origen de replicación de amplio espectro de huésped de un plásmido de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
rev	localización aproximada del sitio del cebador inverso M13 usado en el análisis de secuencias
RB	frontera derecha del ADN-T
TetR	gen de resistencia a la tetraciclina que confiere resistencia al antibiótico tetraciclina
-20	localización aproximada del sitio de cebador M13 - 20 usado en el análisis de secuencias
RK2	origen de plásmido RK2 Gram-negativo de amplio espectro de huésped

5 La Figura 2 es una representación en diagrama del plásmido pCGP602, pCGP601 y pCGP176 que contiene clones de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1* de *P. hybrida* cv. OGB. El fragmento de *F3'5'H* de petunia *petHf1* se usó en la preparación de construcciones que contienen el clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia. Los fragmentos marcados con ³²P del fragmento *BspHI/FspI* de 1,6 kb se usaron para sondar las bibliotecas de ADNc de pétalo. Se marcan los sitios de endonucleasa de restricción seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

10 La Figura 3 es una representación en diagrama del plásmido pCGP175 que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H* *petHf2* de petunia de *P. hybrida* cv. OGB. Se marcan los sitios de endonucleasa de restricción seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

15 La Figura 4 es una representación en diagrama del plásmido pCGP1303 que contiene un subclon del clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1* de pCGP601. La construcción de pCGP1303 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

20 La Figura 5 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1452. El gen *AmCHS 5': petHf1: petD8 3'* de pCGP485 fue clonado en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1452 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

25 La Figura 6 es una representación en diagrama del plásmido binario pWTT2132 (DNAP) que contiene el gen marcador de selección 35S 5': *SuRB* y un sitio de clonación múltiple. Se facilita una descripción de pWTT2132 en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

30 La Figura 7 es una representación en diagrama del plásmido pCGP725. El gen *AmCHS 5': petHf1: petD8 3'* de pCGP485 se clonó en el vector pBluescript II SK (+). La construcción de pCGP725 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

35 La Figura 8 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1453. El gen *Mac: petHf1: mas 3'* de pCGP628 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1453 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

40 La Figura 9 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1457. El gen *petD8 5': petHf1: petD8 3'* de pCGP1107 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1457 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

45 La Figura 10 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1461. El gen *shortpetFLS 5': petHf1: petFLS 3'* de pCGP497 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1461 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

50 La Figura 11 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1616. El gen *petRT 5': petHf1: nos 3'* de pCGP846 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1616 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios seleccionados de restricción de endonucleasa. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 12 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1623. El gen *mas/35S: petHf1: ocs 3'* de pCGP1619 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico

SuRB. La construcción de pCGP1623 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

- 5 La Figura 13 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1638. El gen *CaMV 35S: petHf1: nos 3'* de pCGP1636 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1636 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 10 La Figura 14 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1860. El gen *RoseCHS 5': petHf1: nos 3'* de pCGP200 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1860 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 15 La Figura 15 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2123. El gen *CaMV 35S: petHf2: ocs 3'* de pCGP2109 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2123 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 20 La Figura 16 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1988. El sitio de donación múltiple del vector binario pWTT2132 (DNAP) se sustituyó con el sitio de clonación múltiple de pNEB193 (New England Biolabs). La construcción de pCGP1988 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 25 La Figura 17 es una representación en diagrama del plásmido pCGP2105. El casete de expresión *35S 5': ocs 3'* con múltiples sitios de restricción de endonucleasa entre los fragmentos de promotor y terminador esta en un esqueleto del vector pBluescript SK (+). La construcción de pCGP2105 se describe en el Ejemplo 4. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 30 La Figura 18 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1307. El gen *petD8 5': GUS: petD8 3'* de pCGP1106 se clonó en el vector binario pCGN1548 en una orientación en tándem con el gen marcador de selección quimérico *nptII*. La construcción de pCGP1307 se describe en el Ejemplo 6. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 35 La Figura 19 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1506. El gen *longpetFLS 5': GUS: petFLS 3'* de pCGP496 se clonó en el vector binario pBIN19 en una orientación en tándem con el gen marcador de selección quimérico *nptII*. La construcción de pCGP1506 se describe en el Ejemplo 6. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 40 La Figura 20 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1626. El gen *ChrysCHS 5': GUS: nos 3'* de pCGP1622 se clonó en el vector binario pWTT2132 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1626 se describe en el Ejemplo 6. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 45 La Figura 21 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1641. El gen *petRT 5': GUS: petRT 3'* de pCGP1628 se clonó en el vector binario pWTT2132 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1641 se describe en el Ejemplo 6. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 50 La Figura 22 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1861. El gen *RoseCHS 5': GUS: nos 3'* de pCGP197 se clonó en el vector binario pWTT2132 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1861 se describe en el Ejemplo 6. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 55 La Figura 23 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1953. El gen *AmCHS 5': GUS: petD8 3'* de pCGP1952 se clonó en el vector binario pWTT2132 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1953 se describe en el Ejemplo 6. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 60 La Figura 24 es una representación en diagrama del plásmido binario pWTT2084 (DNAP) que contiene un gen *35S 5': GUS: ocs 3'* en una orientación convergente con el gen marcador de selección quimérico *SuRB*. Se facilita una descripción de pWTT2084 en el Ejemplo 6. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.
- 65 La Figura 25 es una representación en diagrama del plásmido pCGP1959 que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H BP#18* de *Viola spp.* cv. pensamiento negro en un esqueleto de pBluescript SK II (+). Se facilita una descripción de

pCGP1959 en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

5 La Figura 26 es una representación en diagrama del plásmido pCGP1961 que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H BP#40* de *Viola spp.* cv. pensamiento negro en un esqueleto de pBluescript SK II (+). Se facilita una descripción de pCGP1961 en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

10 La Figura 27 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1972. El gen *AmCHS 5': BP#18: petD8 3'* de pCGP1970 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1972 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

15 La Figura 28 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1973. El gen *AmCHS 5': BP#40: petD8 3'* de pCGP1971 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1973 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

20 La Figura 29 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1967. El gen *CaMV 35S: BP#18:ocs 3'* de pCGP1965 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1967 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

25 La Figura 30 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1969. El gen *CaMV 35S: BP#40:ocs 3'* de pCGP1966 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1969 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

30 La Figura 31 es una representación en diagrama del plásmido pCGP1995 que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H Sal#2* de *Salvia spp.* en un esqueleto de pBluescript SK II (+). Se facilita una descripción de pCGP1995 en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

35 La Figura 32 es una representación en diagrama del plásmido pCGP1999 que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H Sal#47* de *Salvia spp.* en un esqueleto de pBluescript SK II (+). Se facilita una descripción de pCGP1999 en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

40 La Figura 33 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2121. El gen *AmCHS 5': Sal#2: petD8 3'* de pCGP2116 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2121 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

45 La Figura 34 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2122. El gen *AmCHS 5': Sal#47: petD8 3'* de pCGP2117 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2122 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

50 La Figura 35 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2120. El gen *CaMV 35S: Sal#2: ocs 3'* de pCGP2112 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2120 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

55 La Figura 36 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2119. El gen *CaMV 35S: Sal#47: ocs 3'* de pCGP2111 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2119 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

60 La Figura 37 es una representación en diagrama del plásmido pCGP2110 que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H Soll#5* de *Sollya spp.* en un esqueleto de pBluescript SK II (+). Se facilita una descripción de pCGP2110 en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

65 La Figura 38 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2130. El gen *AmCHS 5': Soll#5: petD8 3'* de pCGP2128 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2130 se describe en el Ejemplo 7. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción

de las abreviaturas.

La Figura 39 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2131. El gen *CaMV 35S: Soll#5: ocs 3'* de pCGP2129 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2131 se describe en el Ejemplo 7. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 40 es una representación en diagrama del plásmido pCGP2231 que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H Kenn#31* de *Kennedia spp.* en un esqueleto de pBluescript SK II (+). Se facilita una descripción de pCGP2231 en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 41 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2256. El gen *AmCHS 5': Kenn#31: petD8 3'* de pCGP2242 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2256 se describe en el Ejemplo 7. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 42 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2252. El gen de *CaMV 35S: Kenn#31: ocs 3'* de pCGP2236 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2252 se describe en el Ejemplo 7. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 43 es una representación en diagrama del plásmido pBHF2F que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H BpeaHF2* de longitud completa de *Clitoria ternatea* en un esqueleto de pBluescript SK II (+). Se facilita una descripción de pBHF2F en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 44 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2135. El gen *AmCHS 5': BpeaHF2: petD8 3'* de pCGP2133 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2135 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 45 es una representación en diagrama del plásmido binario pBEBF5. El gen *eCaMV 35S: BpeaHF2: nos 3'* se construyó sustituyendo el fragmento *GUS* de pBE2113-GUSs con el clon de ADNc de *F3'5'H BpeaHF2* de *Clitoria* de pBHF2F. La construcción de pBEBF5 se describe en el Ejemplo 7. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 46 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP2134. El gen *CaMV 35S: BpeaHF2: ocs 3'* de pCGP2132 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP2134 se describe en el Ejemplo 7. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 47 es una representación en diagrama del plásmido pG48 que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H Gen#48* de *Gentiana triflora* en un esqueleto de pBluescript SK II (+). Se facilita una descripción de pG48 en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 48 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1498. El gen *AmCHS 5': Gen#48: petD8 3'* de pCGP1496 se clonó en el vector binario pCGP1988 en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1498 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 49 es una representación en diagrama del plásmido binario pBEGHF48. El gen *eCaMV 35S: Gen#48: nos 3'* se construyó sustituyendo el fragmento *GUS* de pBE2113-GUSs con el clon de ADNc de *F3'5'H Gen#48* de *Gentiana* de pG48. La construcción de pBEGHF48 se describe en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 50 es una representación en diagrama del plásmido binario pCGP1982. El gen *CaMV 35S: Gen#48: ocs 3'* de pCGP1981 se clonó en el vector binario pWTT2132 (DNAP) en una orientación en tándem con el gen quimérico *SuRB*. La construcción de pCGP1982 se describe en el Ejemplo 7. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 51 es una representación en diagrama del plásmido pLFH8 que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H LBG* de *Lavandula nil* en un esqueleto de pBluescript SK II (+). Se facilita una descripción de pLFH8 en el Ejemplo 7. Se marcan los sitios de restricción de endonucleasa seleccionados. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

La Figura 52 es una representación en diagrama del plásmido binario pBELF8. El gen *eCaMV 35S: LBG: nos 3'* se construyó sustituyendo el fragmento GUS de pBE2113-GUSs con el clon de ADNc de *F3'5'H LBG* de *Lavandula* de pLHF8. La construcción de pBELF8 se describe en el Ejemplo 7. Refiérase a la Tabla 2 y a la Tabla 4 para una descripción de las abreviaturas.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Se han identificado, clonado y evaluado secuencias genéticas que codifican polipéptidos que tienen actividad de F3'5'H. Las secuencias genéticas recombinantes de la presente invención como se han definido en las reivindicaciones permiten la modulación de la expresión de genes que codifican esta enzima, por ejemplo, por expresión *de novo*, expresión en exceso, supresión de sentido, inhibición antisentido, actividad de ribozima, minimiza y ADNzima, inducción de ARNi o inducción de la metilación u otras actividades de silenciamiento transcripcional o postranscripcional. La inducción de ARNi incluye moléculas genéticas tales como ADN o ARN de horquilla, de cadena doble corta y ADN o ARN de cadena parcialmente doble con uno o dos nucleótidos protuberantes de cadena sencilla. La capacidad para controlar la síntesis de F3'5'H en plantas permite la modulación de la composición de antocianinas individuales, además de la alteración de niveles relativos de flavonoles y antocianinas, permitiendo así la manipulación del color de los pétalos. Además, la presente invención se extiende a plantas y partes reproductivas o vegetativas de las mismas que incluyen flores, frutos, semillas, verduras, hojas, tallos y similares. La presente invención se extiende adicionalmente a plantas ornamentales transgénicas o genéticamente modificadas. El término "transgénico" también incluye plantas de progenie y plantas de genética posterior y/o cruces de las mismas a partir de plantas transgénicas primarias.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada para su uso como un promotor que es operable en tejido de pétalo de rosa que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:30 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias con SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:30 o una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con al menos una de SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:30 o un complemento de las mismas bajo condiciones de alta rigurosidad.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la molécula de ácido nucleico de promotor anteriormente definida operativamente ligada a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H), en la que la secuencia de nucleótidos está seleccionada de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:31 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias con SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:31 o una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con al menos una de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:31 o un complemento de las mismas bajo condiciones de alta rigurosidad, en el que la expresión de dicha molécula de ácido nucleico que codifica una F3'5'H en un tejido de pétalo produce niveles detectables de *moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina* como se mide por una técnica cromatográfica.

En el presente documento se desvela una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica una F3'5'H o un polipéptido que tiene actividad de F3'5'H en la que la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en un tejido de pétalo de rosa produce un transcrito de longitud completa que es detectable por un análisis de transferencia Northern de ARN total aislado a partir de pétalos de rosa.

En el presente documento también se describe y ejemplifica la identificación, clonación y manipulación de secuencias genéticas que codifican una F3'5'H que actúa de DHK, además de DHQ. La enzima F3'5'H puede ser una F3'5'H de pensamiento, salvia, Sollya, lavanda o Kennedia. La enzima F3'5'H también puede considerarse que incluye un polipéptido o proteína que tiene una actividad de F3'5'H o actividad similar a F3'5'H. Esta última engloba derivados que tienen actividades de F3'5'H alteradas.

En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, o es complementaria a una secuencia que codifica una F3'5'H o un mutante funcional, derivado, parte, fragmento, homólogo o análogo de la misma en la que la molécula de ácido nucleico se caracteriza por lo siguiente:

(i) el transcrito de F3'5'H en tejido de pétalo de rosa es de nivel y tamaño suficiente para codificar una F3'5'H resultante en moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina detectables en el tejido de pétalo de rosa como se mide por un procedimiento cromatográfico (por ejemplo CCF o HPLC);

(ii) el transcrito de F3'5'H en tejido de pétalo de rosa es de longitud completa y se detecta por análisis de transferencia Northern del ARN total aislado de tejido de pétalo de rosa

(iii) la F3'5'H en tejido de pétalo de rosa produce moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina detectables como se mide por un procedimiento cromatográfico (por ejemplo, CCF o HPLC); y/o

5 (iv) la F3'5'H produce un cambio de color visible en tejido de pétalo de rosa.

10 El término pigmentos basados en delphinidina incluye la antocianidina, la delphinidina o cualquier derivado de los mismos que incluyen, pero no se limitan a, formas glucosiladas, aciladas, metiladas u otras formas modificadas. Las formas metiladas de la delphinidina incluyen, pero no se limitan a, la antocianidina petunidina (metilada en la posición 3'), malvidina (metilada en las posiciones 3' y 5'), 5-O metilmalvidina (metilada en las posiciones 5, 3' y 5'), 5,7-O dimetilmalvidina (metilada en las posiciones 5, 7, 3' y 5'). Las antocianidinas metiladas también pueden modificarse por glucosilación y acilación. El término antocianinas define formas glucosiladas de las antocianidinas respectivas.

15 Por el término "molécula de ácido nucleico" se entiende una secuencia genética en una condición que se produce no naturalmente. Generalmente, esto significa aislado de su estado natural o sintetizado o derivado de un ambiente que se produce no naturalmente. Más específicamente, incluye moléculas de ácido nucleico formadas o mantenidas *in vitro*, incluyendo fragmentos de ADN genómico, moléculas recombinantes o sintéticas y ácidos nucleicos en combinación con ácidos nucleicos heterólogos. También se extiende al ADN o ADNc genómico o a partes de los mismos que codifican F3'5'H o una parte de los mismos en orientación inversa con respecto a su propio promotor o a otro. Se extiende adicionalmente a secuencias que se producen naturalmente siguiendo al menos una purificación parcial con respecto a otras secuencias de ácidos nucleicos.

25 El término "secuencias genéticas" se usa en el presente documento en su sentido más general y engloba cualquier serie contigua de bases de nucleótidos que especifican directamente, o mediante una serie de bases complementarias, una secuencia de aminoácidos en una enzima F3'5'H. Una secuencia de aminoácidos tal puede constituir una F3'5'H de longitud completa tal como se expone en SEQ ID NO:10 (pensamiento) o SEQ ID NO:12 (pensamiento) o SEQ ID NO:14 (salvia) o SEQ ID NO:16 (salvia) o SEQ ID NO:18 (Sollya) o SEQ ID NO:32 (lavanda) o SEQ ID NO:27 (Kennedia) o una forma truncada activa de las mismas o puede corresponderse con una región particular tal como una porción del extremo N, del extremo C o interna de la enzima. Una secuencia genética también puede denominarse una secuencia de nucleótidos e incluye una fusión recombinante de dos o más secuencias.

35 Según los aspectos anteriores, en el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos o secuencia de nucleótidos complementaria sustancialmente como se expone en SEQ ID NO:9 (pensamiento) o SEQ ID NO:11 (pensamiento) o SEQ ID NO:13 (salvia) o SEQ ID NO:15 (salvia) o SEQ ID NO:17 (Sollya) o SEQ ID NO:31 (lavanda) o SEQ ID NO:26 (Kennedia) o que tiene al menos aproximadamente el 50% de similitud con las mismas o que puede hibridarse con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO:26 bajo condiciones de baja rigurosidad.

40 La Tabla 1 proporciona un resumen de los identificadores de secuencia.

45 Porcentajes de similitudes e identidades alternativos (al nivel de nucleótidos o aminoácidos) incluyen al menos aproximadamente el 60% o al menos aproximadamente el 65% o al menos aproximadamente el 70% o al menos aproximadamente el 75% o al menos aproximadamente el 80% o al menos aproximadamente el 85% o al menos aproximadamente el 90% o superior, tal como aproximadamente el 95% o aproximadamente el 96% o aproximadamente el 97% o aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99%, tal como al menos aproximadamente el 60%, 61%, 62%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%.

55 Para los fines de determinación del nivel de rigurosidad para definir las moléculas de ácido nucleico capaces de hibridarse con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO:26, referencia en el presente documento a una baja rigurosidad incluye y engloba de al menos aproximadamente el 0% a al menos aproximadamente el 15% v/v de formamida y de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para hibridación, y al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para condiciones de lavado. Generalmente, la baja rigurosidad es de aproximadamente 25-30 °C a aproximadamente 42 °C. La temperatura puede alterarse y usarse mayores temperaturas para sustituir la inclusión de formamida y/o para dar condiciones de rigurosidad alternativas. Las condiciones de rigurosidad alternativas pueden aplicarse cuando sea necesario, tal como rigurosidad media, que incluye y engloba de al menos aproximadamente 16% v/v a al menos aproximadamente 30% v/v de formamida y de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M de sal para hibridación, y al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M de sal para condiciones de lavado, o alta rigurosidad, que incluye y engloba de al menos aproximadamente 31% v/v a al menos aproximadamente 50% v/v de formamida y de al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M de sal para hibridación, y al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M de sal para condiciones de lavado. En general, el

lavado se lleva a cabo a $T_m = 69,3 + 0,41 (G + C)\%$ (Marmur y Doty, *J. Mol. Biol.* 5:109, 1962). Sin embargo, la T_m de un ADN dúplex disminuye 1 °C con cada incremento del 1% en el número de pares de bases desapareadas (Bonner y Laskey, *Eur. J. Biochem.* 46: 83, 1974). La formamida es opcional en estas condiciones de hibridación. Por consiguiente, niveles particularmente preferidos de rigurosidad se definen como sigue: rigurosidad baja es 6 x tampón SSC, 1% p/v de SDS a 25-42 °C; rigurosidad moderada es 2 x tampón SSC, 1,0% p/v de SDS a una temperatura en el intervalo 20 °C a 65 °C; rigurosidad alta es 0,1 x tampón SSC, 0,1% p/v de SDS a una temperatura de al menos 65 °C.

También se divulgan en el presente documento moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se expone en SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:27 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 50% de similitud con las mismas.

El término similitud como se usa en el presente documento incluye identidad exacta entre secuencias comparadas al nivel de nucleótidos o de aminoácidos. Si hay no identidad al nivel de nucleótidos, la similitud incluye diferencias entre secuencias que producen diferentes aminoácidos que no obstante están relacionados entre sí a niveles estructurales, funcionales, bioquímicos y/o conformacionales. Si hay no identidad al nivel de aminoácidos, la similitud incluye aminoácidos que no obstante están relacionados entre sí a niveles estructurales, funcionales, bioquímicos y/o conformacionales. En una realización particularmente preferida, las comparaciones de nucleótidos y secuencias se hacen a nivel de identidad más que de similitud.

Los términos usados para describir relaciones de secuencias entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "similitud de secuencias", "identidad de secuencias", "porcentaje de similitud de secuencias", "porcentaje de identidad de secuencias", "sustancialmente similar" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene al menos 12, pero frecuentemente 15 a 18 y frecuentemente al menos 25 o más, tal como 30 unidades de monómero, incluyendo nucleótidos y residuos de aminoácidos, de longitud. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se realizan normalmente comparando secuencias de los dos polinucleótidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de normalmente 12 residuos contiguos que se compara con una secuencia de referencia. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse por implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE.UU.) o por inspección y el mejor alineamiento (es decir, resultante del mayor porcentaje de homología con respecto a la ventana de comparación) generado por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia BLAST de programas, por ejemplo, desvelada por Altschul y col. (*Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997). Una discusión detallada de análisis de secuencias puede encontrarse en la unidad 19.3 de Ausubel y col. ("Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15, 1998).

Los términos "similitud de secuencias" e "identidad de secuencias" como se usan en el presente documento se refieren al grado en que las secuencias son idénticas o funcional o estructuralmente similares sobre una base nucleótido por nucleótido o una base aminoácido por aminoácido con respecto a una ventana de comparación. Así, un "porcentaje de identidad de secuencias", por ejemplo, se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las cuales la base de ácidos nucleicos idénticos (por ejemplo, A, T, C, G, I) o los residuos de aminoácidos idénticos (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) se presentan en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencias. Para los fines de la presente invención, se entenderá que "identidad de secuencias" significa el "porcentaje de coincidencia" calculado mediante el programa de ordenador DNASIS (versión 2.5 para Windows; disponible de Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, EE.UU.) usando valores por defecto convencionales como se usan en el manual de referencia adjunto al software. Se aplican comentarios similares a la similitud de secuencias.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden caracterizarse adicionalmente por tener, o haber tenido antes de la derivación, un contenido de AT global inferior (o contenido de GC superior) en comparación con una molécula de ácido nucleico que codifica una F3'5'H, pero que no produce transcrito intacto detectable en tejido de pétalo de rosa o, cuando se expresa, no produce moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina detectables como se mide por un procedimiento cromatográfico tal como CCF o HPLC. Adicionalmente, el % de A o T en la tercera posición de un codón también es inferior a otras enzimas de F3'5'H. Referencia en el

presente documento a un procedimiento cromatográfico incluye un procedimiento relacionado. Por "relacionado" se entiende un procedimiento técnicamente relacionado o un procedimiento que proporciona un resultado similar. Los ejemplos de procedimientos relacionados incluyen otras formas de cromatografía (por ejemplo, cromatografía de gases).

5 Además, las secuencias de nucleótidos que no se expresan bien en tejido de rosa pueden modificarse tal como reduciendo el % de AT global o al menos reduciendo los niveles del % de AT en la tercera posición de un codón para dirigir la expresión en tejido de rosa.

10 También se desvelan oligonucleótidos útiles como sondas genéticas para reacciones de amplificación o como moléculas antisentido o sentido capaces de regular la expresión del gen correspondiente en una planta. Las moléculas sentido incluyen construcciones en horquilla, ADN y ARN de cadena doble corta y ADN y ARN de cadena parcialmente doble con uno o más nucleótidos protuberantes de cadena sencilla. Una molécula antisentido como se usa en el presente documento también puede englobar una construcción genética que comprende el gen genómico
15 estructural o de ADNc o parte del mismo en orientación inversa con respecto a su promotor o a otro. También puede englobar una secuencia genética homóloga. Una molécula de antisentido o sentido también puede dirigirse a porciones terminales o internas del gen que codifica un polipéptido que tiene una actividad de F3'5'H o a combinaciones de los anteriores de tal forma que se reduzca o elimine la expresión del gen.

20 Con respecto al aspecto anteriormente descrito, un oligonucleótido puede comprender de 5-50 nucleótidos, tales como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 que tienen similitud sustancial con una parte o región de una molécula con una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO:26. Por similitud o
25 complementariedad sustancial en este contexto se entiende una similitud hibridable bajo condiciones de rigurosidad baja, alternativa y preferiblemente media y alternativa y lo más preferiblemente alta específicas para hibridación de oligonucleótidos (Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU., 1989). Tal oligonucleótido es útil, por ejemplo, en la selección de secuencias genéticas de F3'5'H a partir de diversas fuentes o para monitorizar una secuencia genética introducida en una planta transgénica. El oligonucleótido preferido está dirigido a una secuencia genética de F3'5'H conservada o a una secuencia conservada dentro de un género de plantas, especie de plantas y/o variedad de plantas.

30 El oligonucleótido anteriormente descrito puede corresponderse con el extremo 5' o 3' de las secuencias genéticas de F3'5'H. Para comodidad, en el presente documento se considera que el extremo 5' define una región sustancialmente entre el codón de iniciación del gen estructural hasta una porción central del gen, y en el presente documento se considera que el extremo 3' define una región sustancialmente entre la porción central del gen y el codón de terminación del gen estructural. Por lo tanto, es evidente que los oligonucleótidos o sondas pueden hibridarse con el extremo 5' o el extremo 3' o con una región común tanto a los extremos 5' como 3'.

40 La secuencia de ácidos nucleicos que codifica una F3'5'H o diversos derivados funcionales de la misma descritos en el presente documento pueden usarse para reducir el nivel de una F3'5'H endógena (por ejemplo, mediante la cosupresión o supresión mediada por antisentido) u otros procesos de silenciamiento genético postranscripcionales (PTGS) que incluyen ARNi o alternativamente la secuencia de ácidos nucleicos que codifica esta enzima o diversos derivados o partes de los mismos se usan en la orientación sentido o antisentido para reducir el nivel de una F3'5'H.
45 El uso de hebras codificantes, dobles o parcialmente sencillas tales como construcciones con bucles en horquilla es particularmente útil en la inducción de una respuesta de PTGS. En otra alternativa podrían usarse ribozimas, minizimas o ADNzimas para inactivar secuencias de ácidos nucleicos diana.

50 La inhibición postranscripcional puede utilizarse para reducir la traducción en material polipeptídico. Alternativamente, la metilación puede ser inducida o retirada.

Referencia en el presente documento a la alteración de una actividad de F3'5'H se refiere a una elevación o reducción de la actividad de hasta el 30% o más preferiblemente del 30-50% o incluso más preferiblemente del 50-75% o todavía más preferiblemente del 75% o más por encima o por debajo de los niveles endógenos o existentes
55 normales de actividad. Tal elevación o reducción puede denominarse modulación de una actividad de la enzima F3'5'H. Generalmente, la modulación está al nivel de la transcripción o traducción de las secuencias genéticas de F3'5'H.

60 Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser un ácido ribonucleico o ácidos desoxirribonucleicos, moléculas de cadena sencilla o doble y lineales o circulares covalentemente cerradas. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico es ADNc. Se desvelan otras moléculas de ácido nucleico que se hibridan bajo condiciones de rigurosidad baja, preferiblemente media y lo mas preferiblemente alta, con las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento y en particular con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO:26 o una parte o región de
65 las mismas. Se describe una molécula de ácido nucleico en la que dicha molécula tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17 o SEQ

ID NO:31 o SEQ ID NO:26 o una molécula que tiene al menos el 40%, más preferentemente al menos el 45%, incluso más preferentemente al menos el 55%, todavía más preferentemente al menos el 65%-70%, y todavía incluso más preferentemente más del 85% de similitud al nivel de secuencia de nucleótidos o de aminoácidos con al menos una o más regiones de la secuencia expuesta en SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO:26 y en las que el ácido nucleico codifica o es complementario a una secuencia que codifica una enzima que tiene una actividad de F3'5'H. Debe observarse, sin embargo, que las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos pueden tener similitudes por debajo de los porcentajes anteriormente facilitados y todavía codificar una actividad de F3'5'H en la que tienen regiones de conservación de secuencias. También se describen moléculas de ácidos nucleicos en forma de cebadores o sondas de oligonucleótidos que pueden hibridarse con una parte de las moléculas de ácidos nucleicos contempladas anteriormente, y en particular aquellas expuestas en SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO:26, bajo condiciones de rigurosidad baja, preferentemente media y lo más preferentemente alta. Preferentemente, la porción se corresponde con el extremo 5' o 3' del gen. Por comodidad, en el presente documento se considera que el extremo 5' define una región sustancialmente entre el codón de iniciación de la secuencia genética estructural hasta una porción central del gen, y en el presente documento se considera que el extremo 3' define una región sustancialmente entre la porción central del gen y el codón de terminación de la secuencia genética estructural. Por lo tanto, es evidente que los oligonucleótidos o sondas pueden hibridarse con el extremo 5' o el extremo 3' o con una región común tanto a los extremos 5' como 3'.

El término gen se usa en su sentido más amplio e incluye ADNc correspondiente a los exones de un gen. Por consiguiente, una referencia en el presente documento a un gen debe considerarse que incluye:

(i) un gen genómico clásico que consiste en secuencias reguladoras de la transcripción y/o de la traducción y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (es decir, intrones, secuencias no traducidas de 5' y 3'); o

(ii) ARNm o ADNc correspondiente a las regiones codificantes (es decir, exones) y secuencias no traducidas de de 5' y 3' del gen.

El término gen también se usa para describir moléculas sintéticas o de fusión que codifican todo o una parte de un producto de expresión. En realizaciones particulares, los términos molécula de ácido nucleico y gen pueden usarse indistintamente.

El ácido nucleico o su forma complementaria puede codificar una enzima de longitud completa o una parte o derivado de la misma. Por "derivado" se entiende cualquier sustitución, delección y/o adición de aminoácidos individuales o múltiples con respecto a la enzima que se produce naturalmente y que retiene una actividad de F3'5'H. A este aspecto, el ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos que se produce naturalmente que codifica una F3'5'H o puede contener sustituciones, delecciones y/o adiciones de nucleótidos individuales o múltiples a dicha secuencia que se produce naturalmente. Un ácido nucleico o su forma complementaria también pueden codificar una "parte" de la F3'5'H, bien sea activa o inactiva, y tal molécula de ácido nucleico puede ser útil como sonda de oligonucleótido, cebador para reacciones en cadena de la polimerasa o en diversas técnicas mutagénicas o para la generación de moléculas antisentido.

Referencia en el presente documento a una "parte" de una molécula de ácido nucleico, secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos se refiere preferiblemente a una molécula que contiene al menos aproximadamente 10 nucleótidos contiguos o cinco aminoácidos contiguos, según sea apropiado.

Los derivados de inserción de aminoácidos de la F3'5'H descritos en el presente documento incluyen fusiones del extremo amino y/o carboxilo, además de inserciones dentro de secuencias de aminoácidos individuales o múltiples. Las variantes de secuencias de aminoácidos de inserción son aquellas en las que uno o más residuos de aminoácidos se introducen en un sitio predeterminado en la proteína, aunque también es inserción aleatoria con selección adecuada del producto resultante. Las variantes de delección se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia. Las variantes de aminoácidos de sustitución son aquellas en las que al menos un residuo en la secuencia ha sido eliminado y en su lugar se inserta un residuo diferente. Sustituciones típicas son aquellas hechas según la Tabla 3.

TABLA 3: Residuos adecuados para sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Sustituciones a modo de ejemplo
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser

Gln	Asn; Glu
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile; Val
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu; Met

5 Cuando la F3'5'H se derivatiza por sustitución de aminoácidos, los aminoácidos se sustituyen generalmente por otros aminoácidos que tienen propiedades similares, tales como hidrofobia, hidrofilia, electronegatividad, cadenas laterales voluminosas y similares. Las sustituciones de aminoácidos son normalmente de residuos individuales. Las inserciones de aminoácidos usualmente están en el orden de aproximadamente 1-10 residuos de aminoácidos y las deleciones variarán de aproximadamente 1-20 residuos. Preferiblemente, las deleciones o inserciones se hacen en pares adyacentes, es decir, una deleción de dos residuos o inserción de dos residuos.

10 Las variantes de aminoácidos denominadas anteriormente pueden prepararse fácilmente usando técnicas sintéticas de péptidos bien conocidas en la técnica, tales como síntesis de péptidos en fase sólida (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149, 1964) y similares, o por manipulaciones de ADN recombinante. Las técnicas para hacer mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene secuencias conocidas o parcialmente conocidas son bien conocidas e incluyen, por ejemplo, mutagénesis de M13. La manipulación de la secuencia de ADN para producir proteínas de variantes que se manifiestan como variantes de sustitución, inserción o deleción se describen convenientemente, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989, arriba).

20 Otros ejemplos de mutantes recombinantes o sintéticos y derivados de la enzima F3'5'H incluyen sustituciones, deleciones y/o adiciones individuales o múltiples de cualquier molécula asociada a la enzima tal como hidratos de carbono, lípidos y/o proteínas o polipéptidos.

25 Los términos "análogos" y "derivados" también se extienden a cualquier equivalente químico funcional de una F3'5'H y también a cualquier derivado de aminoácido descrito anteriormente. Por comodidad, referencia a F3'5'H en el presente documento incluye referencia a cualquier mutante, derivado, parte, fragmento, homólogo o análogo funcional del mismo.

30 Los métodos desvelados en el presente documento se ejemplifican usando secuencias de ácidos nucleicos de pensamiento, salvia, Sollya o lavanda o *Kennedia* ya que éstas representan la fuente más conveniente y preferida de material hasta la fecha. Sin embargo, un experto en la materia apreciará inmediatamente que pueden aislarse secuencias similares a partir de cualquier número de fuentes tales como otras plantas o ciertos microorganismos. Ejemplos de otras fuentes adecuadas de genes que codifican F3'5'H incluyen, pero no se limitan a, *Vitis spp.*, *Babiana stricta*, *Pinus spp.*, *Picea spp.*, *Larix spp.*, *Phaseolus spp.*, *Vaccinium spp.*, *Cyclamen spp.*, *Iris spp.*, *Pelargonium spp.*, *Liparieae*, *Geranium spp.*, *Pisum spp.*, *Lathyrus spp.*, *Clitoria spp.*, *Catharanthus spp.*, *Malva spp.*, *Mucuna spp.*, *Vicia spp.*, *Saintpaulia spp.*, *Lagerstroemia spp.*, *bouchina spp.*, *Plumbago spp.*, *Hypocalyptus spp.*, *Rhododendron spp.*, *Linum spp.*, *Macroptilium spp.*, *Hibiscus spp.*, *Hydrangea spp.*, *Cymbidium spp.*, *Millettia spp.*, *Hedysarum spp.*, *Lespedeza spp.*, *Asparagus spp.*, *Antigonon spp.*, *Freesia spp.*, *Brunella spp.*, *Clarkia spp.*, etc.

40 Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una F3'5'H puede introducirse en y expresarse en una planta transgénica en cualquier orientación proporcionando así un medio tanto para convertir sustratos adecuados, si se sintetizan en la célula vegetal, finalmente en DHM, como alternativamente para inhibir tal conversión de metabolitos reduciendo o eliminando actividad de F3'5'H endógena o existente. La producción de estos sustratos 3',5'-hidroxilados se convertirá posteriormente en pigmentos basados en delfinidina que modificarán el color del pétalo y pueden contribuir a la producción de un color más azul. La expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta puede ser constitutiva, inducible o de desarrollo y también puede ser específica para tejido. La palabra

“expresión” se usa en su sentido más amplio para incluir la producción de ARN o de tanto ARN como proteína. También se extiende a la expresión parcial de una molécula de ácido nucleico.

5 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método de producción de una planta que florece transgénica que puede sintetizar una F3'5'H, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta adecuada con una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de promotor desvelada en las reivindicaciones operativamente ligada a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una F3'5'H como se define en las reivindicaciones en condiciones que permitan la eventual expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar
10 dicha planta transgénica durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La planta transgénica puede así producir F3'5'H no indígena a niveles elevados con respecto a la cantidad expresada en una planta no transgénica comparable.

15 Otro aspecto de la presente invención contempla un método de producción de una planta transgénica con actividad de flavonoide 3',5'-hidroxilasa indígena reducida o existente, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de promotor desvelada en las reivindicaciones operativamente ligada a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica una actividad de F3'5'H como se define en las reivindicaciones, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cuando sea necesario
20 cultivar dicha planta transgénica en condiciones suficientes para permitir la expresión del ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, una enzima “indígena” es aquella que es nativa a o que se expresa de forma natural en una célula particular. Una enzima “no indígena” es una enzima no nativa a la célula pero que se expresa mediante la introducción de material genético en una célula vegetal por ejemplo, mediante un transgén. Una
25 enzima “endógena” es una enzima producida por una célula, pero que puede o puede no ser indígena para esa célula.

Alternativamente, dicho método puede comprender transformar establemente una célula de una planta adecuada con una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención o su secuencia complementaria, regenerar una
30 planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para alterar el nivel de actividad de la F3'5'H indígena o existente. Preferiblemente, el nivel alterado sería menor que el nivel indígena o existente de actividad de F3'5'H en una planta no transgénica comparable. Sin querer limitarse a la presente invención, una teoría del modo de acción es que la reducción de la actividad de F3'5'H indígena requiere la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos introducida o su secuencia complementaria. Sin embargo, la expresión de la secuencia genética introducida o su complemento puede no requerirse para alcanzar el efecto deseado: a saber, una planta que florece que presenta propiedades florales o de inflorescencia alteradas.
35

También se describe un método de producción de una planta que florece que presenta propiedades florales o de inflorescencia alteradas, comprendiendo dicho método alteración del gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa mediante modificación de las secuencias indígenas mediante recombinación de homólogos de un gen *F3'5'H* apropiadamente alterado o derivado o parte del mismo introducido en la célula de planta, y regenerar la planta genéticamente modificada a partir de la célula.
40

Las características florales o de inflorescencia alteradas pueden incluir la producción de diferentes tonalidades de flores azules o púrpura o rojas u otros colores, dependiendo del genotipo y de las condiciones fisiológicas de la planta receptora.
45

Por consiguiente, se desvela un método de producción de una planta transgénica capaz de expresar un gen recombinante que codifica una F3'5'H o parte de la misma o que lleva una secuencia de ácidos nucleicos que es sustancialmente complementaria a toda o una parte de una molécula de ARNm que codifica la F3'5'H, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta adecuada con la molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, o complementaria a una secuencia que codifica, una F3'5'H, cuando sea necesario, bajo condiciones que permitan la eventual expresión de dicha molécula de ácido nucleico aislada y regenerar una planta transgénica a partir de la célula. Por planta adecuada se entiende una planta capaz de producir DHK y poseer las propiedades fisiológicas apropiadas requeridas para el desarrollo del color deseado.
50
55

Un experto en la materia reconocerá inmediatamente las variaciones aplicables a los métodos de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas, tal como aumentar o disminuir la expresión de la enzima presente de forma natural en una planta diana que conduce a diferentes tonalidades de colores tales como diferentes tonalidades de azul, púrpura o rojo.
60

Por tanto, la presente invención se extiende a todas las plantas transgénicas o partes de células de las mismas de plantas transgénicas o progenie de las plantas transgénicas como se define en las reivindicaciones que contienen las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención como se define en las reivindicaciones o formas antisentido de las mismas y/u homólogos o formas relacionadas de las mismas y, en particular, aquellas plantas
65

transgénicas que presentan propiedades florales o de inflorescencia alteradas. Las plantas transgénicas pueden contener una molécula de ácido nucleico introducida que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica una F3'5'H. Generalmente, el ácido nucleico se introduciría establemente en el genoma de la planta, aunque la presente invención también se extiende a la introducción de una
 5 secuencia de nucleótidos de F3'5'H dentro de una secuencia de ácidos nucleicos de replicación autónoma tal como un virus de ADN o de ARN capaz de replicarse dentro de la célula vegetal. La invención también se extiende a semillas de tales plantas transgénicas. Tales semillas, especialmente si están coloreadas, son útiles como marcas de propiedad para plantas. La presente invención engloba todos y cada uno de los métodos de introducción de material genético en células vegetales que incluyen, pero no se limitan a, transformación mediada por
 10 *Agrobacterium*, bombardeo de partículas biolísticas, etc.

Otro aspecto de la presente invención contempla el uso de extractos de plantas transgénicas o partes de plantas o células de las mismas de las plantas transgénicas o progenie de las plantas transgénicas que contienen las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención como se define en las reivindicaciones y, en particular, los
 15 extractos de aquellas plantas transgénicas cuando se usan como aromatizante o aditivo alimentario o producto para la salud o bebida o zumo o colorante.

Las partes de plantas contempladas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, flores, frutos, verduras, frutos secos, raíces, tallos, hojas o semillas.
 20

Los extractos de la presente invención pueden derivarse de las plantas o parte de planta o células de la misma de varias maneras diferentes que incluye, pero no se limitan a, la extracción química o extracción por calor o filtración o exprimiendo o pulverización.
 25

La planta, parte de la planta o células de la misma o extracto pueden utilizarse en cualquier número de diferentes maneras tales como por ejemplo la producción de un aromatizante (por ejemplo, una esencia para alimentos), un aditivo alimentario (por ejemplo, un estabilizador, un colorante), un producto para la salud (por ejemplo, un antioxidante, un comprimido), una bebida (por ejemplo, vino, bebida espirituosa, té) o un zumo (por ejemplo, zumo de frutas) o colorante (por ejemplo, colorante alimentario, colorante para textiles, pigmento, pintura, tinte).
 30

En el presente documento también se desvelan formas recombinantes de F3'5'H. Las formas recombinantes de la enzima proporcionarán una fuente de material para investigación, por ejemplo, enzimas más activas y puede ser útil en el desarrollo de sistemas *in vitro* para la producción de compuestos coloreados.
 35

Todavía otro aspecto de la presente invención contempla el uso de las secuencias genéticas descritas en las reivindicaciones en la fabricación de una construcción genética capaz de expresar una F3'5'H o regular por disminución una enzima F3'5'H indígena en una planta.
 40

El término construcción genética se ha usado indistintamente en toda la memoria descriptiva y reivindicaciones con los términos "molécula de fusión", "molécula recombinante", "secuencia de nucleótidos recombinante". Una construcción genética puede incluir una molécula de ácido nucleico individual que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína señal o puede contener múltiples marcos de lectura abiertos que codifican 2 o más proteínas. También puede contener un promotor operativamente ligado a 1 o más de los marcos de lectura abiertos.
 45

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un organismo procariota o eucariota no humano que lleva una secuencia genética que codifica una F3'5'H como se define en las reivindicaciones extracromosómicamente en forma de plásmido.
 50

En el presente documento también se desvela un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se expone en SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:27 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 50% de similitud con SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:27 o un derivado de dicho polipéptido.
 55

Un "polipéptido recombinante" significa un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos introducida en una célula directa o indirectamente por intervención humana o en un padre u otro familiar o precursor de la célula. Un polipéptido recombinante también puede hacerse usando sistemas de transcripción *in vitro* libres de células. El término "polipéptido recombinante" incluye un polipéptido aislado o, cuando está presente, en una célula o preparación celular. También puede estar en una planta o partes de una planta regeneradas a partir de una célula que produce dicho polipéptido.
 60

Un "polipéptido" incluye un péptido o proteína y está englobado por el término "enzima".

El polipéptido recombinante también puede ser una molécula de fusión que comprende dos o más secuencias de aminoácidos heterólogas.
 65

En el presente documento también se desvelan:

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) o un polipéptido que tiene actividad de F3'5'H, en la que la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en un tejido de pétalo de rosa produce niveles detectables de *moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina* como se mide por una técnica cromatográfica.
- 10 2. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica una F3'5'H o un polipéptido que tiene actividad de F3'5'H, en la que la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en un tejido de pétalo de rosa produce un nivel y longitud suficiente de transcrito que se traduce en dicha F3'5'H como se ha determinado por niveles detectables de *moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina* como se mide por una técnica cromatográfica.
- 15 3. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 1 ó 2, en la que la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en dicho pétalo de rosa produce un cambio de color visualmente detectable.
- 20 4. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de una planta seleccionada de la lista que comprende *Viola spp.*, *Salvia spp.*, *Sollya spp.*, *Lavandula spp.* y *Kennedia spp.*
- 25 5. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 4, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de una planta de *Viola spp.*
- 30 6. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 5, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de *Viola spp.*, cultivar pensamiento negro.
- 35 7. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 5 ó 6, en la que la secuencia de nucleótidos codifica una F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:10 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:12.
- 40 8. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 7, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:9, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:11, una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:9 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:11 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad.
- 45 9. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 8, que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:9.
- 50 10. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 8, que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:11.
- 55 11. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 4, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de *Salvia spp.*
- 60 12. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 11, en la que la secuencia de nucleótidos codifica una F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:14 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:16.
- 65 13. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 12 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:13, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:15, una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:13 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:15 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad.
14. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 13 que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:13.
15. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 13 que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta

en SEQ ID NO:15.

16. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 4, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de *Sollya spp.*

17. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 16, en la que la secuencia de nucleótidos codifica una F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:18 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:18.

18. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 17 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:17, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:17 y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:17 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad.

19. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 18 que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:17.

20. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 4, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de *Kennedia spp.*

21. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 20, en la que la secuencia de nucleótidos codifica una F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de SEQ ID NO:27 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:27.

22. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 21 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:26, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:26 y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:26 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad.

23. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 22 que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:26.

24. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 4, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de *Lavandula spp.*

25. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 24, en la que la secuencia de nucleótidos codifica una F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:32 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:32.

26. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 25 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:31, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:31 y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:31 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad.

27. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 26 que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:31.

28. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en la que la secuencia de nucleótidos comprende un porcentaje global inferior a o igual al 54% de los nucleótidos

(i) A, o

(ii) T, o

(iii) A y T

en la tercera posición de nucleótido de cada codón.

29. Una construcción que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende:

(i) un promotor que es operable en tejido de pétalo de rosa y, en el que dicho promotor está operativamente ligado a,

(ii) una molécula de ácido nucleico que codifica F3'5'H, o complementaria a una secuencia que codifica una F3'5'H o un polipéptido que tiene actividad de F3'5'H, en la que la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en un tejido de pétalo de rosa produce niveles detectables de *moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina* como se mide por una técnica cromatográfica y, en la que dicha molécula de ácido nucleico se deriva de una planta seleccionada

del grupo que consiste en *Viola spp.*, *Salvia spp.*, *Sollya spp.*, *Lavandula spp.* y *Kennedia spp.*

30. Una construcción que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 5 (i) un promotor que es operable en tejido de pétalo de rosa y, en el que dicho promotor está operativamente ligado a,
- (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica F3'5'H, o complementaria a una secuencia que codifica una F3'5'H o un polipéptido que tiene actividad de F3'5'H, en la que la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en un tejido de pétalo de rosa produce un nivel y longitud suficiente de transcrito que se traduce en dicha F3'5'H como se ha determinado por niveles detectables de *moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina* como se mide por una técnica cromatográfica.

31. La construcción de la realización 29 ó 30, en la que la expresión de dicha construcción en dicho pétalo de rosa produce un cambio de color visualmente detectable.

32. La construcción de una cualquiera de las realizaciones 29 a 31, en la que dicho promotor está seleccionado del grupo que consiste en CHS de rosa, CHS de crisantemo y CaMV 35S.

33. Una construcción de una cualquiera de las realizaciones 29 a 31, en la que dicho promotor comprende SEQ ID NO:5, o un equivalente funcional de la misma.

34. Una construcción de una cualquiera de las realizaciones 29 a 31, en la que dicho promotor comprende SEQ ID NO:30, o un equivalente funcional de la misma.

35. La construcción de una cualquiera de las realizaciones 29 a 34, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de *Viola spp.*

36. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 35, en la que la secuencia de nucleótidos codifica F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:10 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:12.

37. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 36 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:9, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:11, una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:9 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:11 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad.

38. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 37, en la que el gen comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:9.

39. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 37, en la que el gen comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:11.

40. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 29 a 34, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de *Salvia spp.*

41. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 40, en la que el gen comprende una secuencia de nucleótidos que codifica F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:14 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:16.

42. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 41, en la que el gen comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:13, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:15, una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:13 o sus complementos bajo condiciones de baja rigurosidad y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:15 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad.

43. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 42, en la que el gen comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:13.

44. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 42, en la que el gen comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:15.

45. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 29 a 34, en la que el gen se deriva de *Sollya spp.*
- 5 46. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 45, en la que el gen codifica una F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:18 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:18.
- 10 47. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 46, en la que el gen comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:17, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:17 y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:17 o sus complementos bajo rigurosidad baja.
- 15 48. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 47, en la que el gen comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:17.
49. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 29 a 34, en la que el gen se deriva de *Kennedia spp.*
- 20 50. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 49, en la que el gen codifica F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:27 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:27.
- 25 51. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 50, en la que el gen comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:26, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:26 y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:26 o sus complementos bajo rigurosidad baja.
- 30 52. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 51, en la que el gen comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:26.
53. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 29 a 34, en la que el gen se deriva de *Lavandula spp.*
- 35 54. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 53, en la que el gen codifica F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:32 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:32.
- 40 55. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 54, en la que el gen comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:31 y una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:31, una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ ID NO:31 o sus complementos bajo condiciones de baja rigurosidad.
- 45 56. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 55, en la que el gen comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:31.
- 50 57. Un método de producción de una planta que florece transgénica que puede sintetizar una F3'5'H, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta adecuada con una secuencia de ácidos nucleicos como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 28, en condiciones que permitan la eventual expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos.
- 55 58. Un método de producción de una planta transgénica con actividad de F3'5'H indígena o existente reducida, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta adecuada con una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 28, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cuando sea necesario cultivar dicha planta transgénica en condiciones suficientes para permitir la expresión del ácido nucleico.
- 60 59. Un método de producción de una planta genéticamente modificada con actividad de F3'5'H indígena o existente reducida, comprendiendo dicho método alterar el gen *F3'5'H* mediante modificación de las secuencias indígenas mediante recombinación de homólogos de un gen *F3'5'H* apropiadamente alterado como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 28, o un derivado o parte del mismo introducido en la célula de planta, y regenerar la planta genéticamente modificada a partir de la célula.
- 65 60. Un método de producción de una planta que florece transgénica que presenta propiedades de inflorescencia

alteradas, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta adecuada con una secuencia de ácidos nucleicos como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 28, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos.

5 61. Un método de producción de una planta que florece que presenta propiedades de inflorescencia alteradas, comprendiendo dicho método alterar un gen *F3'5'H* como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 28, mediante modificación de las secuencias indígenas mediante recombinación de homólogos a partir de un gen *F3'5'H* apropiadamente alterado o derivado o parte del mismo introducido en la célula de planta, y regenerar la planta genéticamente modificada a partir de la célula.

15 62. Un método de producción de una planta transgénica que puede expresar un gen recombinante que codifica *F3'5'H* como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 28, o parte del mismo o que lleva una secuencia de ácidos nucleicos que es sustancialmente complementaria a toda o una parte de una molécula de ARNm que codifica dicha *F3'5'H*, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta adecuada con la molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, o complementaria a una secuencia que codifica *F3'5'H*, cuando sea necesario, en condiciones que permitan la eventual expresión de dicha molécula de ácido nucleico aislada, y regenerar una planta transgénica a partir de la célula.

20 63. Una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 1 a 28.

25 64. Una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 1 a 28 o que comprende un nivel reducido de expresión de una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las realizaciones 1 a 28.

30 65. Una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 1 a 28 o que comprende un elevado nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las realizaciones 1 a 28.

66. La planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma una cualquiera de las realizaciones 63 a 65, en la que la parte de planta está seleccionada de sépalo, bráctea, pecíolo, pedúnculo, ovario, anteras, flores, frutos, frutos secos, raíces, tallos, hojas, semillas.

35 67. La planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma de una cualquiera de las realizaciones 63 a 66, en la que la planta es una especie hortícola, especie agrícola o especie ornamental.

40 68. Uso de una molécula de ácido nucleico aislada como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 28 en la fabricación de una construcción genética que puede expresar *F3'5'H* o regular por disminución una enzima *F3'5'H* indígena en una planta.

69. Una construcción silenciadora de genes que comprende una molécula de ácido nucleico aislada como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 28 o un complejo de la misma.

45 70. La planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma de 63 a 66, en la que la planta está seleccionada de una rosa, clavel, lisianthus, petunia, lirio, pensamiento, gerbera, crisantemo, geranio, *Torenia*, *Begonia*, *Cyclamen*, *Nierembergia*, *Catharanthus*, *Pelargonium*, orquídea, uva, manzana, *Euphorbia* o *Fuchsia*.

50 71. Un extracto de una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma de una cualquiera de las realizaciones 63 a 67 y 70.

72. El extracto de la realización 71, en el que el extracto es un aromatizante o aditivo alimentario o producto para la salud o bebida o zumo o colorante.

55 73. El método de una cualquiera de las realizaciones 57 a 62, en el que la planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma presentan inflorescencia alterada.

74. Una *F3'5'H* recombinante aislada o péptido que tiene actividad de *F3'5'H* codificado por una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 28.

60 75. La *F3'5'H* recombinante aislada o péptido que tiene actividad de *F3'5'H* de la realización 74, en la que la *F3'5'H* recombinante o péptido que tiene actividad de *F3'5'H* es una molécula de fusión que comprende dos o más secuencias de aminoácidos heterólogos.

65 76. Una *F3'5'H* recombinante aislada o péptido que tiene actividad de *F3'5'H* molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las realizaciones 1 a 28 que comprende una fusión de dos o más secuencias de nucleótidos

heterólogas.

- 5 77. Un organismo procariota que lleva una secuencia genética que codifica una molécula de F3'5'H según una cualquiera de las realizaciones 1 a 28 extracromosómicamente en forma de plásmido.
78. Un organismo eucariota que lleva una secuencia genética que codifica una molécula de F3'5'H según una cualquiera de las realizaciones 1 a 28 extracromosómicamente en forma de plásmido.
- 10 79. El uso de una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las realizaciones 1 a 28 en la fabricación de una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma.
- 15 80. La planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma de la realización 79, en la que la planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma presenta flores o inflorescencia alteradas.
81. El uso de una secuencia de ácidos nucleicos como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 28 en la fabricación de una construcción genética que puede expresar F3'5'H o regular por disminución una enzima F3'5'H indígena en una planta.
- 20 82. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica una F3'5'H o un polipéptido que tiene actividad de F3'5'H, en la que dicha molécula de ácido nucleico se deriva de campanilla.
- 25 83. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 81, en la que la secuencia de nucleótidos codifica una F3'5'H que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de SEQ ID NO:21 y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de similitud con SEQ ID NO:21.
- 30 84. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 83 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:20, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 40% de identidad con SEQ ID NO:20 y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con SEQ NO:20 o su complemento bajo condiciones de baja rigurosidad.
- 35 85. La molécula de ácido nucleico aislada de la realización 84 que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:20.
86. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en la que la secuencia de nucleótidos comprende un porcentaje global inferior a o igual al 55% de los nucleótidos
- 40 (i) A, o
- (ii) T, o
- (iii) A y T
- 45 87. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende SEQ ID NO:5 o un equivalente funcional de la misma.
88. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende SEQ ID NO:30 o un equivalente funcional de la misma.
- 50 89. Una molécula de ácido nucleico aislada que ha sido modificada de manera que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica F3'5'H o un polipéptido que tiene actividad de F3'5'H, en la que expresión de dicha molécula de ácido nucleico en un tejido de pétalo de rosa produce niveles detectables de *moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina* como se mide por una técnica cromatográfica, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de una planta seleccionada de la lista que comprende *Petunia spp.*, *Gentiana spp.* y *Clitoria spp.*
- 55 90. Una molécula de ácido nucleico aislada que ha sido modificada de manera que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica F3'5'H o un polipéptido que tiene actividad de F3'5'H, en la que expresión de dicha molécula de ácido nucleico en un tejido de pétalo de rosa produce un nivel y longitud suficiente de transcrito que se traduce en dicha F3'5'H como se ha determinado por niveles detectables de *moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina* como se mide por una técnica cromatográfica, en la que la molécula de ácido nucleico se deriva de una planta seleccionada de la lista que comprende petunia, genciana y campanilla.
- 60 91. El uso de una secuencia de ácidos nucleicos como se define en realización 89 ó 90 en la fabricación de una construcción genética que puede expresar F3'5'H o regular por disminución una enzima F3'5'H indígena en una planta.
- 65

92. El uso de una secuencia de ácidos nucleicos como se define en realización 89 ó 90 en la fabricación de una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma.

5 El presente documento se describe adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Métodos generales

10 En general, los métodos seguidos fueron como se describe en Sambrook y col. (1989, arriba) o Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU., 2001 o Plant Molecular Biology Manual (2ª edición), Gelvin y Schilperoot (eds), Kluwer Academic Publisher, Los Países Bajos, 1994 o Plant Molecular Biology Labfax, Croy (ed), Bios scientific Publishers, Oxford, RU, 1993.

15 Los vectores de clonación pBluescript y PCR script se obtuvieron de Stratagene, EE.UU. La pCR7 2.1 se obtuvo de Invitrogen, EE.UU.

Transformación de E. coli

20 Las cepas de *Escherichia coli* usadas fueron:

DH5α

25 supE44, Δ (lacZYA-ArgF)U169, (ø801acZΔM15), hsdR17(r_k⁻, m_k⁺),
recA1, endA1, gyrA96, thi-1, re1A1, deoR. (Hanahan, *J. Mol. Biol.* 166: 557, 1983)

XL1-Blue

30 supE44, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1,
lac⁻, [F[']proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(tet^R)] (Bullock y col., *Biotechniques* 5: 376, 1987).

35 Cepa BL21-CodonPlus-RIL

ompT hsdS(Rb- mB-) dcm + Tet^r gal endA Hte [argU ileY lecrW Cam^r]

M15 *E. coli* se deriva de *E. coli* K12 y tiene el fenotipo Nal^s, Str^s, Rif^s, Thi⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺.

40 La transformación de las cepas de *E. coli* se realizó según el método de Inoue y col. (*Gene* 96: 23-28, 1990).

Cepas y transformaciones de Agrobacterium tumefaciens

45 La cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* usada fue AGLO (Lazo y col., *Bio/technology* 9: 963-967, 1991).

Se introdujo ADN de plásmido en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGLO añadiendo 5 µg de ADN de plásmido a 100 µl de las células AGLO competentes preparadas por inoculación de un cultivo LB de 50 ml (Sambrook y col., 1989, arriba) e incubación durante 16 horas con agitación a 28 °C. Las células se sedimentaron luego y se resuspendieron en 0,5 ml de CaCl₂ 100 mM al 85% (v/v)/ glicerol al 15% (v/v). La mezcla de ADN-*Agrobacterium* se congeló por incubación en N₂ líquido durante 2 minutos y luego se dejó descongelar por incubación a 37 °C durante 5 minutos. La mezcla ADN/bacteriana se dispuso luego sobre hielo durante 10 minutos adicionales. Las células se mezclaron luego con 1 ml de medio LB (Sambrook y col., 1989 arriba) y se incubaron con agitación durante 16 horas a 28 °C. Se seleccionaron células de *A. tumefaciens* que llevaban el plásmido sobre placas de LB agar que contenían antibióticos apropiados tales como 50 µg/ml de tetraciclina o 100 µg/ml de gentamicina. La confirmación del plásmido en *A. tumefaciens* se hizo por mapeo con endonucleasas de restricción de ADN aislado a partir de los transformantes resistentes a antibiótico.

Ligaciones de ADN

60 Las ligaciones de ADN se llevaron a cabo usando el kit de ligación de Amersham o el kit de ligación de Promega según procedimientos recomendados por el fabricante.

Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN

65 Los fragmentos se aislaron generalmente sobre un gel de agarosa al 1% (p/v) y se purificaron usando el kit de

extracción en gel QIAEX II (Qiagen) o el kit Bresaclean (Bresatec, Australia) siguiendo procedimientos recomendados por el fabricante.

5 Reparación de extremos de nucleótidos protuberantes después de la digestión con endonucleasas de restricción

Los extremos de nucleótidos protuberantes 5' se repararon usando ADN polimerasa (fragmento de Klenow) según protocolos convencionales (Sambrook y col., 1989 arriba). Los extremos de nucleótidos protuberantes 3' se repararon utilizando T4 ADN polimerasa según protocolos convencionales (Sambrook y col., 1989 arriba).

10 Eliminación de grupos fosforilo de ácidos nucleicos

Normalmente se utilizó fosfatasa alcalina de gamba (SAP) (USB) para eliminar grupos fosforilo de vectores de clonación para prevenir la recircularización según las recomendaciones del fabricante.

15 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A menos que se especifique otra cosa, las condiciones de PCR usando ADN plásmido como molde incluyeron usar 2 ng de ADN de plásmido, 100 ng de cada cebador, 2 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 5 µl de 10 x tampón Taq ADN polimerasa, 0,5 µl de Taq ADN polimerasa en un volumen total de 50 µl. Las condiciones de ciclado comprendieron una etapa inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, seguida por 35 ciclos de 94 °C durante 20 s, 50 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 minuto con un tratamiento final a 72 °C durante 10 minutos antes del almacenamiento a 4 °C.

Las PCR se realizaron en un Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600.

25 Marcado con ³²P de sondas de ADN

Los fragmentos de ADN (50 a 100 ng) se marcaron radiactivamente con 50 µCi de [α-³²P]-dCTP usando un kit Gigaprime (Geneworks). El [α-³²P]-dCTP no incorporado se eliminó por cromatografía sobre columnas Sephadex G-50 (fina) o columnas de cromatografía Microbiospin P-30 Tris (BioRad).

Aislamiento de plásmidos

Se analizaron colonias individuales para insertos inoculando caldo LB (Sambrook y col., 1989, arriba) con una selección de antibióticos apropiada (por ejemplo, 100 µg/ml de ampicilina o 10 a 50 µg/ml de tetraciclina, etc.), e incubando el cultivo líquido a 37 °C (para *E. coli*) o 29 °C (para *A. tumefaciens*) durante ~16 horas con agitación. El ADN de plásmido se purificó usando el procedimiento de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989, arriba) o usando el sistema de purificación de ADN de minipreparaciones The WizardPlus SV (Promega) o el kit Qiagen Plasmid Mini (Qiagen). Una vez que se había determinado la presencia de un inserto, se prepararon cantidades más grandes de ADN de plásmido a partir de 50 ml de cultivos durante la noche usando el procedimiento de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989, arriba) o el kit QIAfilter Plasmid Midi (Qiagen) y siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante.

Análisis de secuencias de ADN

La secuenciación de ADN se llevo a cabo usando los kits PRISM (marca registrada) Ready Reaction Dye Primer Cycle Sequencing de Applied Biosystems. Se siguieron los protocolos suministrados por el fabricante. Las reacciones de secuenciación en ciclo se llevaron a cabo usando una máquina de PCR Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 9600). Las ejecuciones de la secuenciación se realizaron generalmente por Australian Genome Research Facility en The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research (Melbourne, Australia) o localmente en un secuenciador de ADN automatizado 373A (Applied Biosystems).

Las secuencias se analizaron usando una aplicación MacVector™ (versión 6.5.3) (Oxford Molecular Ltd., Oxford, Inglaterra).

Las búsquedas de homología por comparación con las bases de datos Genbank, SWISS-PROT y EMBL se realizaron usando los programas FASTA y TFASTA (Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(8): 2444-2448, 1988) o los programas BLAST (Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-410, 1990). Se obtuvieron las similitudes de secuencias en porcentaje usando el programa LALIGN (Huang y Miller, *Adv. Appl. Math.* 12: 373-381, 1991) o el programa ClustalW (Thompson y col., *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680, 1994) dentro de la aplicación MacVector™ (Oxford Molecular Ltd., Inglaterra) usando parámetros por defecto.

Las alineaciones de secuencias múltiples se produjeron usando ClustalW (Thompson y col., 1994, arriba) usando parámetros por defecto.

Ejemplo 2

Transformaciones de plantasTransformaciones de *Petunia hybrida* (Sw63 x Skr4)

5 Como se describe en Holton y col. (1993a, arriba) por cualquier otro método bien conocido en la técnica.

Transformaciones de *Rosa hybrida*

10 Como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº 542.841 (PCT/US91/04412) o Robinson y Firoozabady (*Scientia Horticulturae*, 55: 83-99, 1993), Rout y col. (*Scientia Horticulturae*, 81: 201-238, 1999) o Marchant y col. (*Molecular Breeding* 4: 187-194, 1998) o por cualquier otro método bien conocido en la técnica.

15 Se obtuvieron esquejes de *Rosa hybrida* generalmente de Van Wyk y Son Flower Supply, Victoria.

Transformaciones de *Dianthus caryophyllus*

20 Solicitud de patente internacional nº PCT/US92/02612 (transformación de claveles). Como se describe en la solicitud de patente internacional nº PCT/AU96/00296 (clavel violeta), Lu y col. (*Bio/Technology* 9: 864-868, 1991), Robinson y Firoozabady (1993, arriba) o por cualquier otro método bien conocido en la técnica.

Se obtuvieron esquejes de *Dianthus caryophyllus* cv. Kortina Chanel o Monte Lisa de Van Wyk and Son Flower Supply, Victoria.

Ejemplo 3Análisis transgénicoCodificación de color

30 Se usó la carta de colores de la Real Sociedad Hortícola (Kew, Reino Unido) para proporcionar una descripción del color observado. Proporcionan un medio alternativo por el que describir los fenotipos de color observados. Sin embargo, los números designados deben tomarse solamente como una guía de los colores percibidos y no deben considerarse limitantes de los posibles colores que pueden obtenerse.

Análisis cromatográfico

40 Se realizaron análisis por cromatografía en capa fina (CCF) y por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) generalmente como se describe en Brugliera y col. (*Plant J.* 5, 81-92, 1994).

Extracción de antocianidinas

45 Antes del análisis por HPLC, las moléculas de antocianina y flavonol presentes en los extractos de pétalos y estambres se sometieron a hidrólisis ácida para eliminar restos de glicosilo del núcleo de antocianidina o flavonol. Se usaron patrones de antocianidina y flavonol para ayudar a identificar los compuestos presentes en los extractos florales.

50 Las antocianidinas en la mezcla de reacción se analizaron por HPLC mediante elución con gradiente usando condiciones de gradiente de 50% de B a 60% de B durante 10 minutos, luego 60% de B durante 10 minutos y finalmente 60% de B a 100% de B durante 5 minutos cuando el solvente A consistió en TFA: H₂O (5:995) y el solvente B consistió en acetonitrilo: TFA: H₂O (500:5:495). Se usó una columna de cartucho Asahi Pac ODP-50 (250 mm x 4,6 mm de DI) para las separaciones cromatográficas en fase inversa. La velocidad de flujo fue 1 ml/min y la temperatura fue 40 °C. La detección de los compuestos de antocianidina se llevo a cabo usando un detector tridimensional Shimadzu SPD-M6A a 400-650 nm.

55 Los picos de antocianidina se identificaron por referencia a picos conocidos, concretamente moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina, petunidina, malvidina, cianidina y peonidina.

Etapas del desarrollo de las flores*Petunia*

Se recolectaron flores de *Petunia hybrida* cv. Skr4 x Sw63 en las siguientes etapas de desarrollo definidas:

65 Etapa 1: Yema cerrada sin pigmentar.

Etapa 2: Yema cerrada pigmentada.

Etapa 3: Yema pigmentada con corola emergente.

5 Etapa 4: Flor abierta pigmentada con antera intacta (pre-dehiscencia)

Etapa 5: Flor completamente abierta con anteras dehiscentes.

10 Para el análisis por CCF o HPLC se recolectaron pétalos de flores de la etapa 4 en la etapa de máxima acumulación de pigmento.

Para el análisis de transferencia Northern se recolectaron pétalos de flores de las etapas 2 a 3 en la etapa de máxima expresión de los genes de la ruta de los flavonoides.

15 *Clavel*

Se recolectaron flores de *Dianthus caryophyllus* en las siguientes etapas de desarrollo definidas:

Etapa 1: Yema cerrada, pétalos no visibles.

20

Etapa 2: Yemas de flores en abertura: puntas de pétalos visibles.

Etapa 3: Puntas de casi todos los pétalos expuestas. "Etapa de brochazo".

25 Etapa 4: Pétalos externos a un ángulo de 45° con respecto al tallo.

Etapa 5: Flor completamente abierta.

30 Para los análisis por CCF o HPLC se recolectaron pétalos de flores de la etapa 4 en la etapa de máxima acumulación de pigmento.

Para el análisis de transferencia Northern se recolectaron pétalos de flores de la etapa 3 en la etapa de máxima expresión de los genes de la ruta de los flavonoides.

35 *Rosa*

Las etapas del desarrollo de la flor *Rosa hybrida* se definen como sigue:

Etapa 1: Yema apretadamente cerrada sin pigmentar.

40

Etapa 2: Yema apretadamente cerrada pigmentada.

Etapa 3: Yema cerrada pigmentada; sépalos comenzando a abrirse.

45 Etapa 4: La yema de la floral comienza a abrir; pétalos fuertemente pigmentados; se han separado los sépalos.

Etapa 5: Sépalos completamente desdoblados; algún rizamiento. Los pétalos están fuertemente pigmentados y desdoblados.

50 Para los análisis por CCF o HPLC se recolectaron pétalos de flores de la etapa 4 en la etapa de máxima acumulación de pigmento.

Para el análisis de transferencia Northern se recolectaron los pétalos de flores de las etapas 3 a 4 en la etapa de máxima expresión de los genes de la ruta de los flavonoides (Tanaka y col., *Plant Cell Physiol.*, 36(6): 1023-1031, 1995).

55

Mediciones de antocianina/flavonol por mediciones espectrofotométricas

60 Se añadieron aproximadamente 200 mg de tejido de pétalo fresco a 2 ml de metanol/HCl al 1% (v/v) y se incubaron durante ~16 horas a 4 °C. Luego se hizo una dilución 1 en 20 (por ejemplo, 50 µl se llevaron a 1000 µl) y se registro la absorbancia a 350 nm y 530 nm.

Entonces se calcularon las cantidades aproximadas de flavonoles y antocianinas (nmoles/gramo) según las siguientes formulas:

65

Contenido de antocianina

$$\frac{(A_{530}/34.000) \times \text{volumen de tampón de extracción (ml)} \times \text{factor de dilución} \times 10^6}{\text{masa de tejido de pétalo (gramos)}}$$

Contenido de flavonol

5

$$\frac{(A_{530}/14.300 \times \text{volumen de tampón de extracción (ml)} \times \text{factor de dilución} \times 10^6}{\text{masa de tejido de pétalo (gramos)}}$$

Análisis de transferencia Northern/de ARN

10 Se monitorizó la transcripción de un gen transferido aislando ARN y estimando la cantidad y tamaño del transcrito esperado. Se usó análisis de transferencia Northern para monitorizar el nivel en estado estacionario de transcritos particulares en pétalos. Se determinó que un transcrito estaba intacto o era de longitud completa basándose en el tamaño estimado esperado del gen usado. En general, cuando se usaron ADNc como secuencias codificantes, el tamaño del transcrito esperado sería el tamaño del ADNc más cualquier componente de 5' sin traducir del fragmento de promotor fusionado más cualquier secuencia de 3' sin traducir del fragmento del terminador fusionado. En algunos casos, si una región de ADNc contuviera un sitio de poliadenilación putativo y la región de terminador contuviera un sitio de poliadenilación putativa, se detectarían 2 transcritos. Uno sería de un tamaño coherente con la poliadenilación que se produce precisamente aguas abajo del sitio de poliadenilación dentro de la secuencia de ADNc. El segundo transcrito sería más grande y coherente con el transcrito que está siendo poliadenilado después del sitio de poliadenilación dentro del fragmento de terminador.

15

Se aisló ARN total a partir de pétalos u hojas usando un kit RNeasy para plantas (QIAGEN) siguiendo procedimientos recomendados por el fabricante. Para muestras de rosa se añadió PVP al 1% (p/v) al tampón de extracción.

25

Las muestras de ARN (5 µg) se sometieron a electroforesis a través de geles de formaldehído 2,2 M /agarosa al 1,2% p/v usando tampón de electroforesis que contiene ácido morfolinopropanosulfónico 40 mM (pH 7,0), acetato de sodio 5 mM, EDTA 0,1 mM (pH 8,0). El ARN se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV. El ARN ribosómico se usó generalmente como guía en la confirmación de que el ARN no había sido degradado por ribonucleasas intra o extracelulares. El ARN se transfirió a filtros de membrana Hybond-N (Amersham) y se trató como se describe por el fabricante.

30

Se incluyeron muestras de control sobre geles de ARN como medida de la integridad de la sonda radiomarcada y como guías para los tamaños de transcrito esperados. Los controles para los genes *petHf1* y *petHf2* incluyeron ARN aislado de pétalos OGB de petunia (etapas 3 a 4) o de flores de claveles transgénicos que previamente habían mostrado que acumulaban transcritos de *petHf1*. Los controles para otros genes *F3'5'H* incluyeron generalmente ARN aislado de pétalos de la misma especie de la que se había aislado la secuencia de *F3'5'H*.

35

Las transferencias de ARN se sondaron con fragmentos marcados con ³²P. La prehibridación (1 hora a 42 °C) y la hibridación (16 horas a 42 °C) de los filtros de membrana se llevó a cabo en formamida al 50% v/v, NaCl 1 M, SDS al 1% p/v, sulfato de dextrano al 10% p/v. Los filtros de membrana se lavaron generalmente en 2 x SSC, 1% p/v de SDS a 65 °C durante entre 1 y 2 horas y luego 0,2 x SSC, SDS al 1% p/v a 65 °C durante entre 0,5 y 1 hora. Las membranas de filtro se expusieron generalmente a película Kodak XAR con una pantalla de intensificación a -70 °C durante 16 a 72 horas.

40

45

Ejemplo 4

Introducción de genes quiméricos F3'5'H de petunia en rosa

50 Como se ha descrito en la introducción, el patrón de hidroxilación del anillo B de la molécula de antocianidina desempeña una función clave en la determinación del color del pétalo. La producción del dihidroflavonol DHM conduce a la producción de pigmentos púrpuras/azules basados en delfinidina en plantas tales como petunia. La ausencia de actividad de F3'5'H ha sido correlacionada con la ausencia de flores azules en muchas especies de plantas tales como *Rosa*, *Gerbera*, *Antirrhinum*, *Dianthus* y *Dendranthema*.

55

Basándose en el éxito de la producción de pigmentos basados en delfinidina en una línea de petunia mutante (Holton y col., 1993a, arriba y la solicitud de patente internacional nº PCT/AU92/00334), en flores de tabaco (solicitud de patente internacional nº PCT/AU92/00334) y en flores de clavel (solicitud de patente internacional nº PCT/AU96/00296), genes quiméricos *F3'5'H* de petunia similares también se introdujeron en rosas con el fin de producir novedosos pigmentos basados en delfinidina y modificar el color de la flor.

60

Preparación de construcciones del gen quimérico F3'5'H de petunia

En la Tabla 4 se enumera un resumen de fragmentos de promotor, terminador y codón usados en la preparación de construcciones y las abreviaturas respectivas.

5 TABLA 4: Abreviaturas usadas en preparaciones de construcciones

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
<i>AmCHS 5'</i>	Fragmento de promotor de 1,2 kb del gen chalcona sintasa (CHS) de <i>Antirrhinum majus</i> (Sommer y Saedler, <i>Mol Gen. Genet</i> , 202: 429-434, 1986)
CaMV 35S	~0,2 kb que incorpora fragmento <i>Bgl</i> II que contiene la región del promotor del gen del virus del mosaico de la coliflor (<i>CaMV 35S</i>) (Franck y col., <i>Cell</i> 21: 285-294, 1980, Guilley y col., <i>Cell</i> , 30: 763-773, 1982)
<i>35S5'</i>	Fragmento de promotor del gen <i>CaMV 35S</i> (Franck y col., 1980, arriba) con una secuencia conductora no traducida en 5' de ~60 pb del gen de la proteína de unión a clorofila a/b de petunia (gen <i>Cab 22</i>) (Harpster y col., <i>MGG</i> , 212: 182-190, 1988)
<i>chrysCHS5'</i>	Región de promotor de un gen <i>CHS</i> de crisantemo (SEQ ID NO:30)
<i>eCaMV 35S</i>	Promotor <i>CaMV 35S</i> potenciado como se describe en Mitsuahara y col., <i>Plant Cell Physiol.</i> 37:49-59, 1996
<i>GUS</i>	Secuencia codificante de β-glucuronidasa (<i>GUS</i>) (Jefferson y col., <i>EMBO J.</i> 6: 3901-3907, 1987)
<i>Mac</i>	Promotor híbrido que consiste en el promotor de la manopina sintasa (<i>mas</i>) y una región potenciadora de <i>CaMV 35S</i> (Comai y col., <i>Plant Mol. Biol.</i> 15: 373-381, 1990)
<i>mas/35S</i>	Promotor híbrido que consiste en una región de promotor del gen <i>CaMV 35S</i> con elementos potenciadores de un fragmento del promotor del gen manopina sintasa (<i>mas</i>) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Janssen y Gardner, <i>Plant Molecular Biology</i> , 14: 61-72, 1989)
<i>mas 5'</i>	Región de promotor de <i>mas</i> de <i>A. tumefaciens</i>
<i>mas 3'</i>	Región del terminador del gen <i>mas</i> de <i>A. tumefaciens</i>
<i>nos 5'</i>	Región de promotor del gen nopalina sintasa (<i>nos</i>) de <i>A. tumefaciens</i> (Depicker y col., <i>J Mol. and Appl. Genetics</i> 1: 561-573, 1982)
<i>nos 3'</i>	Región del terminador del gen <i>nos</i> de <i>A. tumefaciens</i> (Depicker y col., 1982, arriba)
<i>nptII</i>	Gen de resistencia a la kanamicina (codifica neomicina fosfotransferasa que desactiva antibióticos aminoglicosídicos tales como kanamicina, neomicina y G418)
<i>ocs 3'</i>	Fragmento del terminador de ~1,6 kb del gen octopina sintasa de <i>A. tumefaciens</i> (descrito en Janssen y Gardner, 1989, arriba)
<i>petD8 5'</i>	Región de promotor de ~3,2 kb de un gen de proteína de transferencia de fosfolípidos (<i>D8</i>) de <i>Petunia hybrida</i> (Holton, Isolation and characterization of petal specific genes from <i>Petunia hybrida</i> . Tesis doctoral, Universidad de Melbourne, Australia, 1992) (SEQ ID NO:24)
<i>petD8 3'</i>	Región del terminador de ~0,7 kb de un gen de proteína de transferencia de fosfolípidos (<i>D8</i>) de <i>Petunia hybrida</i> cv. OGB (Holton, 1992, arriba)
<i>long petFLS 5'</i>	Fragmento de ~4,0 kb que contiene la región de promotor de un gen flavonol sintasa (<i>FLS</i>) de <i>P. hybrida</i>
<i>short petFLS 5'</i>	Fragmento de ~2,2 kb que contiene la región de promotor del gen <i>FLS</i> de <i>P. hybrida</i>
<i>petFLS 3'</i>	Fragmento de ~0,95 kb que contiene la región del terminador del gen <i>FLS</i> de <i>P. hybrida</i>
<i>petHf1</i>	Clon de ADNc de <i>F3'5'H Hf1</i> de petunia (Holton y col., 1993a, arriba) (SEQ ID NO:1)
<i>petHf2</i>	Clon de ADNc de <i>F3'5'H Hf2</i> de petunia (Holton y col., 1993a, arriba) (SEQ ID NO:3)
<i>petRT5'</i>	Región de promotor de un gen antocianidin-3-glucósido ramnosiltransferasa (<i>3RT</i>) de <i>P. hybrida</i> (Brugliera, Characterization of floral specific genes isolated from <i>Petunia hybrida</i> . RMIT, Australia. Tesis doctoral, 1994)
<i>petRT3'</i>	Región del terminador de un gen <i>3RT</i> de <i>P. hybrida</i> (Brugliera, 1994, sura)
<i>RoseCHS 5'</i>	Fragmento de ~2,8 kb que contiene la región de promotor de un gen <i>CHS</i> de <i>Rosa hybrida</i> (SEQ ID: 5)

<i>SuRB</i>	Gen de resistencia a clorsulfuron (codifica acetolactato sintasa) con su propio terminador de <i>Nicotiana tabacum</i> (Lee y col., <i>EMBO J.</i> 7: 1241-1248, 1988)
-------------	--

Con el fin de producir moléculas de delphinidina y basadas en delphinidina en pétalos de rosa se prepararon varias construcciones de vectores binarios utilizando los fragmentos de ADNc de *F3'5'H* de petunia y diversos fragmentos de promotor y terminador. Los genes quiméricos *F3'5'H* de petunia demostraron ser satisfactorios en clavel y petunia conduciendo a transcritos de *F3'5'H* intactos detectables (como se detecta por análisis de transferencia Northern) y a la producción de pigmentos de moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina. La Tabla 5 resume la lista de construcciones de vectores binarios que contienen fragmentos de ADNc de *F3'5'H* de petunia.

TABLA 5: Resumen de casetes de expresión del gen quimérico *F3'5'H* de petunia contenidos en construcciones de vectores binarios usados en la transformación de rosas (véase la Tabla 4 para una explicación de las abreviaturas)

PLÁSMIDO	GEN <i>F3'5'H</i>	GEN DEL MARCADOR DE SELECCIÓN
pCGP1452	<i>AmCHS 5': petHf1: petD8 3'</i>	<i>35S 5': SURB</i>
pCGP1453	<i>Mac: petHf1: mas 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>
pCGP1457	<i>petD8 5': petHf1: petD8 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>
pCGP1461	<i>short petFLS 5': petHf1: petFLS 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>
pCGP1616	<i>petRT 5': petHf1: nos 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>
pCGP1638	<i>CaMV 35S: petHf1: ocs 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>
pCGP1623	<i>mas 35S: petHf1: ocs 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>
pCGP1860	<i>RosaCHS 5': petHf1: nos 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>
pCGP2123	<i>CaMV 35S: petHf2: ocs 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>

Aislamiento de clones de ADNc de *F3'5'H* de petunia (*petHf1* y *petHf2*)

El aislamiento y caracterización de clones de ADNc de *F3'5'H* de petunia (*petHf1* y *petHf2* contenidos en pCGP602 (Figura 2) y pCGP175 (Figura 3), respectivamente) (SEC ID NO:1 y SEQ ID NO:3, respectivamente) se ha descrito en la solicitud de patente internacional nº PCT/AU92/00334 y Holton y col. (1993a, arriba).

Los plásmidos pCGP601 (Figura 2), pCGP602 (Figura 2), pCGP176 (Figura 2) contienen homólogos del clon de ADNc de *petHf1 F3'5'H* de petunia. El plásmido pCGP601 contiene un homólogo de *F3'5'H* de petunia *petHf1* que incluye 52 pb de secuencia no traducida de 5'. El plásmido pCGP602 contiene un homólogo de *F3'5'H* de petunia *petHf1* que incluye 125 pb de secuencia no traducida de 5' (SEQ ID NO:1). El plásmido pCGP176 (descrito en Holton y col., 1993a arriba) contiene un homólogo de *F3'5'H* de petunia *petHf1* que incluye 27 pb de secuencia no traducida de 5' y adicionalmente ~127 pb de la secuencia no traducida de 3' sobre el clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1* en pCGP602.

Construcción de pCGP1303 (*petHf1* en esqueleto de pUC19)

El clon ADNc de *F3'5'H* de petunia contenido en el plásmido pCGP601 (descrito anteriormente) (Figura 2) incluyó 52 pb de secuencia no traducida de 5' y 141 pb de secuencia no traducida de 3' incluyendo 16 pb de la cola poli A. El plásmido pCGP601 (Figura 2) se linealizó inicialmente por digestión con la endonucleasa de restricción *BspHI*. Los extremos se repararon y el clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1* se liberó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Fspl*. La secuencia de reconocimiento de *BspHI* engloba el codón de iniciación de la traducción putativo y la secuencia de reconocimiento de *Fspl* comienza a 2 pb aguas abajo del codón de terminación. El fragmento de 1,6 kb que contiene el clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1* se purificó con los extremos reparados *EcoRI* de pUC19 (New England Biolabs). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis por endonucleasa de restricción del ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP1303 (Figura 4).

Construcción de pCGP627 (*short petHf1* en esqueleto de pBluescript)

El plásmido pCGP176 (Holton y col., 1993a, arriba) (Figura 2) se digirió con la endonucleasa de restricción *SpeI* y *EcoRI*. Los extremos se repararon luego y se permitió que se religaran. El plásmido resultante se designó pCGP627 y contuvo el clon de ADNc idéntico como en pCGP176, excepto que los sitios de endonucleasa de restricción *PstI*, *BamHI* y *SmaI* se eliminaron del sitio de clonación múltiple del vector pBluescript en el extremo 5' del clon de ADNc.

El vector binario pCGP1452 (*AmCHS 5': petHf1: petH8 3'*)

El plásmido pCGP1452 (Figura 5) contiene un gen quimérico *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) bajo el control de un fragmento del promotor del gen chalcona sintasa (CHS) de *Antirrhinum majus* (Sommer y Saedler, 1986, arriba) con un fragmento del terminador del gen proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) (*petD8 3'*) (Holton, 1992, arriba). El casete de *F3'5'H* de petunia quimérico está en una orientación en tándem con respecto al gen *35S 5': SuRB* del vector binario, pWTT2132 (*DNA Plant Technologies*, USA = DNAP) (Figura 6).

Productos intermedios en la preparación del pCGP1452 binario

El vector binario pWTT2132

El plásmido del vector binario pWTT2132 (DNAP) (Figura 6) contiene un gen quimérico que comprende una secuencia del promotor *35S 5'* (Franck y col., 1980, arriba), ligada con la región codificante y una secuencia de terminador para el gen acetolactato sintasa (ALS) del locus *SuRB* de tabaco (Lee y col., 1988, arriba). Se incluye una secuencia conductora de no traducida de 5' de ~60 pb del gen proteína de unión a clorofila a/b de petunia (gen Cab 22) (Harpster y col., *MGG*, 212: 182-190, 1988) entre el fragmento del promotor *35S 5'* y la secuencia de *SuRB*.

Construcción de pCGP725 (*AmCHS 5': petHf1: petD8 3'* en pBluescript)

Un gen quimérico *F3'5'H* de petunia bajo el control del promotor *CHS* de *Antirrhinum majus* (*AmCHS 5'*) con un terminador PLTP de petunia (*petD8 3'*) se construyó clonando el fragmento de *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) *BclI/FspI* de 1,6 kb de pCGP602 (Holton y col., 1993a, arriba) (Figura 2) entre un fragmento del gen *CHS* de *Antirrhinum majus* de 1,2 kb 5' con respecto al sitio de iniciación de la traducción (Sommer y Saedler, 1986, arriba) y un fragmento de PLTP *SmaI/XhoI* de 0,7 kb (*petD8 3'*) de pCGP13Δ*Bam* (Holton, 1992, arriba) 3' con respecto al codón de terminación deducido. El plásmido resultante en un vector de esqueleto de pBluescript II KS (Stratagene, EE.UU.) se designó pCGP725 (Figura 7).

Construcción de pCGP485 y pCGP1452 (vectores binarios *AmCHS 5': petHf1: petD8 3'*)

El gen quimérico *F3'5'H* de pCGP725 (Figura 7) se clonó en el vector binario pCGN1547 que contiene un casete de gen marcador de selección *npII* (McBride y Summerfelt, *Plant Molecular Biology* 14: 269-276, 1990) para crear pCGP485. Un fragmento de 3,5 kb que contenía el casete *AmCHS 5': petHf1: petD8 3'* se liberó tras la digestión de pCGP485 con la endonucleasa de restricción *PstI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento de 3,5 kb purificado se ligó a los extremos *SmaI* del vector binario, pWTT2132 (DNAP). La inserción correcta del fragmento en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado a partir de los transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido se designó pCGP1452 (Figura 5).

Transformación de plantas con pCGP1452

El ADN-T contenido en el plásmido de vector binario pCGP1452 (Figura 5) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP1453 (*Mac: petHf1: mas 3'*)

El plásmido pCGP1453 (Figura 8) contiene un gen quimérico *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) bajo el control de un promotor *Mac* (Comai y col., 1990, arriba) con un fragmento del terminador del gen manopina sintasa de *Agrobacterium* (*mas 3'*). El casete quimérico *F3'5'H* de petunia está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario, pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

Un fragmento de 3,9 kb que contiene el gen *Mac: petHf1: mas 3'* se liberó del plásmido pCGP628 (descrito en la solicitud de patente internacional nº PCT/AU94/00265) tras digestión con la endonucleasa de restricción *PstI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento purificado se ligó con los extremos *SmaI* de pWTT2132 (DNAP). La inserción correcta del gen *Mac: petHf1: mas 3'* en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido se designó pCGP1453 (Figura 8).

Transformación de plantas con pCGP1453

El ADN-T contenido en el plásmido de vector binario pCGP1453 (Figura 8) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP1457 (*petD8 5': petHf1: petD8 3'*)

El plásmido pCGP1457 (Figura 9) contiene un gen quimérico *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) bajo el control de un fragmento del promotor del gen *PLTP* de petunia (*petD8 5'*) con un fragmento del terminador del gen *PLTP* de

petunia (*petD8 3'*). El casete quimérico de *F3'5'H* de petunia está en una orientación en tándem con respecto al gen *35S 5': SuRB* del vector binario, pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCG1457

- 5 Aislamiento del clon genómico D8 de petunia
- Preparación de biblioteca genómica de P. hybrida cv. OGB (Old Glory Blue) en λ2001*
- 10 Se construyó una biblioteca de ADN genómica a partir de ADN de *Petunia hybrida cv. OGB* en el vector λ2001 (Karn y col., *Gene* 32: 217-224, 1984) usando una digestión parcial con *Sau3A* del ADN genómico como se describe en Holton, 1992 (arriba). La selección de la biblioteca genómica OGB para el gen D8 de petunia fue como se describe en Holton, 1992, arriba.

15 Aislamiento del clon genómico de D8 OGB2.6

Se realizó PCR con el fin de encontrar un clon genómico no mutante que represente D8. Se usaron Oligo # 2 (5' a 3' GTTCTCGAGAAAGATAATACAAT) (SEQ ID NO:6) y Oligo #4 (5' a 3' CAAGATCGTAGGACTGCATG) (SEQ ID NO:7) para amplificar fragmentos del gen D8, a través de la región del intrón, usando 4 µl de suspensión de fago de los clones aislados de la selección primaria de la biblioteca genómica OGB. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl que contenía 1 x tampón de amplificación (Cetus), mezcla de dNTP 0,2 mM, <1 µg de ADN molde, 50 pmoles de cada cebador y 0,25 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl - Cetus). Las mezclas de reacción se recubrieron con 30 µl de aceite mineral y se sometieron a ciclos de temperatura usando Gene Machine (Innovonics). Las reacciones se sometieron a ciclos 30 veces usando las siguientes condiciones: 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 50 segundos, 72 °C durante 2 minutos. Un cuarto de cada reacción de PCR se ejecutó sobre un gel de agarosa usando tampón de electroforesis TAE.

Tres clones, λOGB-2.4, λOGB-2.5 y λOGB-2.6 dieron fragmentos de aproximadamente 1 kb, mientras que el clon mutante, λOGB-3.2 (descrito en Holton, 1992, arriba) había producido un producto de 1,25 kb. El clon λOGB-2.6 se eligió para análisis posterior.

pCGP382

El clon genómico λOGB-2.6 contuvo un único fragmento *XbaI* de 3,9 kb que se hibridó con el ADNc de D8. Este fragmento *XbaI* se aisló y purificó y ligó con los extremos *XbaI* de pBluescriptII SK- (Stratagene, EE.UU.). El mapeo de restricción de este clon reveló un sitio *PstI* interno de 350 pb desde el extremo 3'. Sin embargo, el clon genómico "mutante" en pCGP13 tenía un *PstI* interno próximo al "ATG" de iniciación putativo de la región codificante (aproximadamente 1,5 kb desde su extremo 3'). La diferencia en la posición del sitio *PstI* en ambos clones sugirió que el fragmento *XbaI* de λOGB-2.6 no contenía la secuencia genómica completa de *D8*. Se realizó una transferencia Southern sobre ADN de λOGB-2.6 digerido con *PstI*, y se encontró que un fragmento de 2,7 kb se hibridó con el ADNc de *D8*. El mapeo con endonucleasas de restricción confirmó que este fragmento contenía la región codificante 3' y las secuencias flanqueantes.

Con el fin de obtener un fragmento que contuviera la secuencia genómica de *D8* completa se llevaron a cabo varias etapas de clonación. El fragmento *PstI* de λOGB-2.6 de 2,7 kb se purificó y se ligó con los extremos *PstI* de pBluescriptII SK- (Stratagene, EE.UU.). El clon resultante se digirió con *XbaI* para eliminar el fragmento *PstI/XbaI* de 350 pb. Este fragmento se sustituyó con el fragmento *XbaI* de 3,9 kb de λOGB-2.6 para producir el plásmido pCGP382.

Un fragmento de 3,2 kb que contenía la región del promotor del gen *D8 2.6* en pCGP382 se liberó tras la digestión con las endonucleasas de restricción *HindIII* y *NcoI*. El fragmento se purificó y ligó con el fragmento *NcoI/HindIII* de 4,8 kb de pJB1 (Bodeau, Molecular and genetic regulation of Bronze-2 and other maize anthocyanin genes. Disertación, Universidad de Stanford, EE.UU., 1994) para producir pCGP1101 que contenía un casete de *petD8 5': GUS: nos 3'*.

Un fragmento de *F3'5'H* de petunia *petHf1* de 1,6 kb se liberó del plásmido pCGP602 (Holton y col., 1993a, arriba) (SEQ ID NO:1) (Figura 2) tras digestión con las endonucleasas de restricción *BspHI* y *BamHI*. El fragmento se purificó y ligó con el fragmento *NcoI/BamHI* de 6,2 kb del pCGP1101 para producir pCGP1102 que contenía un casete de expresión *petD8 5': petHf1: nos 3'*.

Se purificó un fragmento *BamHI* de *petD8 3'* de 0,75 kb (Holton, 1992, arriba) a partir del plásmido pCGP13Δ*BamHI* y se ligó con los extremos de *BamHI/BglII* de pCGP1102 para producir el plásmido pCGP1107 que contiene un casete de expresión *petD8 5': petHf1: petD8 3'*.

El plásmido pCGP1107 se linealizó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *XbaI*. Los extremos de

nucleótidos protuberantes se repararon y luego el fragmento de 5,3 kb que contenía el casete de expresión *petD8 5': petHf1: petD8 3'* se liberó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *PstI*. El fragmento se purificó y ligó con los extremos *SmaI/PstI* del vector binario pWTT2132 (DNAP) (Figura 6). La inserción correcta del gen *petD8 5': petHf1: petD8 3'* en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcado de selección *35S 5': SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido se designó pCGP1457 (Figura 9).

Transformación de plantas con *Pcgp1457*

10 El ADN-T contenido en el plásmido de vector binario pCGP1457 (Figura 9) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP1461 (*short pet 5': petHf1: pet FLS 3'*)

15 El plásmido pCGP1461 (Figura 10) contiene un gen quimérico F3'5'H de petunia (*petHf1*) bajo el control de un fragmento del promotor del gen flavonol sintasa (*FLS*) de petunia (*short petFLS 5'*) con un fragmento del terminador del gen *FLS* de petunia (*petFLS 3'*). El gen quimérico F3'5'H de petunia está en una orientación en tándem con respecto al gen *35S 5': SuRB* del vector binario, pWTT2132 (Figura 6).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1461

Aislamiento del gen *FLS* de petunia

Preparación de biblioteca genómica de *P. hybrida* cv. Th7

25 Se preparó una biblioteca genómica de *P. hybrida* cv. Th7 según Sambrook y col. (1989, arriba) usando una digestión parcial con *Sau3A* del ADN genómico. El ADN parcialmente digerido se clonó en el vector EMBL-3 lambda (Stratagene, EE.UU.).

30 La biblioteca de ADN genómico Th7 se seleccionó con fragmentos marcados con ³²P de un clon de ADNc de *FLS* de petunia (Holton y col., *Plant J.* 4: 1003-1010, 1993b) usando condiciones de rigurosidad alta.

35 Se eligieron dos clones genómicos (*FLS2* y *FLS3*) para análisis posteriores y se encontró que contenían secuencias aguas arriba de la metionina de iniciación putativa de la región codificante de *FLS* de petunia conteniendo *FLS2* una región de promotor más larga que *FLS3*.

pCGF486

40 Un fragmento de 6 kb se liberó tras la digestión del clon genómico *FLS2* con la endonucleasa de restricción *XhoI*. El fragmento que contenía el gen *FLS* de petunia corto se purificó y ligó con los extremos *XhoI* de pBluescript SK (Stratagene, EE.UU.). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP486.

pCGP487

50 Un fragmento de 9 kb se liberó tras la digestión del clon genómico *FLS3* con la endonucleasa de restricción *XhoI*. El fragmento que contenía el gen *FLS* de petunia se purificó y ligó con los extremos *XhoI* de pBluescript SK (Stratagene, EE.UU.). La inserción correcta del fragmento se estableció por un análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP487.

pCGP717

55 Un fragmento del promotor *FLS* de petunia de 2,2 kb aguas arriba a partir del sitio de iniciación de la traducción putativo se liberó del plásmido pCGP487 tras la digestión con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *PstI*. El fragmento generado se purificó y ligó con los extremos *XhoI/PstI* de pBluescript II SK+ (Stratagene, EE.UU.). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP717.

60

pCGP716

65 Un fragmento del terminador *FLS* de petunia de 0,95 kb aguas abajo del sitio de terminación de la traducción putativo se liberó del plásmido pCGP487 tras la digestión con las endonucleasas de restricción *HindIII* y *SacI*. El fragmento generado se purificó y ligó con los extremos *HindIII/SacI* de pBluescript II KS+ (Stratagene, EE.UU.). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de

transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP716.

Construcción de pCGP493 (casete de expresión short petFLS 5': petFLS 3')

5 Un fragmento de 1,8 kb que contiene el fragmento del promotor *FLS* de petunia corto se amplificó por PCR usando el plásmido pCGP717 como molde y el cebador T3 (Stratagene, EE.UU.) y un cebador *FLS-Nco* (5' AAA ATC GAT ACC ATG GTC TTT TTT TCT TTG TCT ATA C 3') (SEQ ID NO:19). El producto de PCR se digirió con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *Clal* y el fragmento purificado se ligó con los extremos *XhoI/Clal* de pCGP716. La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP493.

Construcción de pCGP497 (casete de expresión short petFLS 5': petHf1: petFLS 3')

15 El clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) se liberó del plásmido pCGP627 (descrito anteriormente) tras la digestión con las endonucleasas de restricción *BspHI* y *FspI*. La secuencia de reconocimiento de *BspHI* engloba el codón de iniciación de la traducción putativo y la secuencia de reconocimiento de *FspI* comienza 2 pb aguas abajo del codón de terminación. El fragmento de *F3'5'H* de petunia *petHf1* generado se purificó y ligó con los extremos *Clal* (extremos reparados)/*NcoI* del plásmido pCGP493. La inserción correcta del fragmento se estableció por el análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP497.

Construcción de pCGP1461 (vector binario short petFLS 5': petHf1: petFLS 3')

25 El plásmido pCGP497 se linealizó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *SacI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y un fragmento de 4,35 kb que contenía el casete de expresión del gen *short petFLS 5': petHf1: petFLS 3'* se libero tras la digestión con la endonucleasa de restricción *KpnI*. El fragmento generado se purificó y ligó con los extremos *PstI* (extremos reparados)/*KpnI* del vector binario pWTT2132 (DNAP) (Figura 6). La inserción correcta del fragmento en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* de pWTT2132 se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP1461 (Figura 10).

Transformación de plantas con pCGP1461

35 El ADN-T contenido en el plásmido de vector binario pCGP1461 (Figura 10) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP1616 (petRT 5': petHf1: nos 3')

40 El plásmido pCGP1616 (Figura 11) contiene un gen quimérico *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) bajo el control de un fragmento del promotor del gen *3RT* de *P. hybrida* (*petRT 5'*) (Brugliera, 1994, arriba) con un fragmento del terminador del gen nopalina sintasa (*nos 3'*) de *Agrobacterium* (Depicker y col., 1982, arriba). El casete quimérico de *F3'5'H* de petunia está en una orientación en tándem con respecto al gen *35S 5': SuRB* del vector binario, pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1616

Aislamiento del gen *3RT* de *Petunia*

50 Construcción de biblioteca de ADN genómico de *P. hybrida* cv. Th7 en EMBL3

Se preparó una biblioteca genómica de *Petunia hybrida* cv. Th7 según Sambrook y col. 1989, arriba, usando una digestión parcial con *Sau3A* del ADN genómico. El ADN parcialmente digerido se clonó en el vector EMBL-3 lambda (Stratagene, EE.UU.). La selección de la biblioteca genómica de Th7 para el gen *3RT* de petunia fue como se describe en Brugliera, 1994, arriba.

60 Un fragmento de 3 kb que contenía el casete *petRT 5': petHf1: nos 3'* se liberó del plásmido pCGP846 (descrito en Brugliera, 1994, arriba) tras la digestión con las endonucleasas de restricción *PstI* y *BamHI*. El fragmento purificado se ligó con los extremos *PstI/BamHI* de pWTT2132 (DNAP) (Figura 6). La inserción correcta del fragmento en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido se designó pCGP1616 (Figura 11).

Transformación de plantas con pCGP1616

65 El ADN-T contenido en el plásmido de vector binario pCGP1616 (Figura 11) se introdujo en rosa mediante

transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP1623 (mas/35S: petHf1: ocs 3')

- 5 El plásmido pCGP1623 (Figura 12) contiene un gen quimérico *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) bajo el control del casete de expresión contenido en pKIWI101 (Janssen y Gardner, 1989, arriba) que consiste en un fragmento del promotor del gen *35S* del virus del mosaico de la coliflor (*35S 5'*) con una secuencia potenciadora del promotor del gen manopina sintasa (*mas*) de *Agrobacterium* y un fragmento del terminador del gen octopina sintasa de *Agrobacterium* (*ocs 3'*). El casete quimérico de *F3'5'H* de petunia está en una orientación en tándem con respecto al gen *35S 5'*: *SuRB* del vector binario, pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1623

- 15 El fragmento de ~1,6 kb del clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1* contenido en el plásmido pCGP1303 (Figura 4) se liberó tras digestión con las endonucleasas de restricción *BspHI* y *SmaI*. El fragmento de *F3'5'H* de petunia *petHf1* se purificó y ligó con un fragmento *NcoI/EcoRI* (extremos reparados) de ~5,9 kb de pKIWI101 (Janssen y Gardner, 1989, arriba) para producir el plásmido pCGP1619.

- 20 Un digestión parcial del plásmido pCGP1619 con la endonucleasa de restricción *XhoI* liberó un fragmento de 4,9 kb que contenía el casete de expresión *mas/35S: petHf1: ocs 3'*. El fragmento se purificó y ligó con los extremos *Sall* de pWTT2132 (DNAP) (Figura 6). La inserción correcta del fragmento en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5'*: *SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido se designó pCGP1623 (Figura 12).

25 Transformación de plantas con pCGP1623

- El ADN-T contenido en el plásmido de vector binario pCGP1623 (Figura 12) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

30 El vector binario pCGP1638 (35S 5': petHf1: ocs 3')

- El plásmido pCGP1638 (Figura 13) contiene un gen quimérico *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) bajo el control de un promotor *CaMV 35S* (*35S 5'*) con un terminador de octopina sintasa (*ocs 3'*). Una secuencia conductora no traducida en 5' de ~60 pb del gen de la proteína de unión a clorofila a/b de petunia (gen *Cab 22*) (Harpster y col., 1988, arriba) está incluido entre el fragmento del promotor *CaMV 35S* y el clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1*. El casete quimérico de *F3'5'H* de petunia está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5'*: *SuRB* del vector binario, pWTT2132 (Figura 6).

40 Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1638

Construcción de pCGP1273

- 45 El plásmido pCGP1273 se construyó subclonando un fragmento de *HindIII/HpaI* de ~3 kb que contenía el gen *35S 5'*: *GUS: ocs 3'* del vector binario pJ3499 (Jones y col., Transgenic Research, 1: 285-297, 1992) con los extremos *HindIII/SmaI* del plásmido pBluescript KS II (+) (Stratagene, EE.UU.).

Construcción de pCGP1634

- 50 Un fragmento de *HindIII/BamHI* de ~3 kb que contenía el gen *35S 5'*: *GUS: ocs 3'* de pCGP1273 se aisló luego y se ligó con los extremos *HindIII/BamHI* del vector de clonación pUC19 (New England Biolabs) para crear el plásmido pCGP1634.

Construcción de pCGP1636

- 55 El fragmento *GUS* del plásmido pCGP1634 se eliminó digiriendo pCGP1634 con las endonucleasas de restricción *NcoI* y *XbaI* y purificando el fragmento de ~3,7 kb que contenían el fragmento del promotor *35S 5'*, el fragmento del terminador *ocs 3'* y el esqueleto del vector pUC19.

- 60 El clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1* se liberó de pCGP1303 (Figura 4) tras la digestión con las endonucleasas de restricción *BspHI* y *XbaI*. El fragmento resultante de ~1,6 kb se purificó y ligó con el fragmento *NcoI/XbaI* de ~3,7 kb de pCGP1634. La inserción correcta del fragmento de *F3'5'H* de petunia *petHf1* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante que contenía un gen *35S 5'*: *petHf1: ocs 3'* se designó pCGP1636.

65

Construcción de pCGP1638

5 El gen 35S 5': *petHf1: ocs 3'* del plásmido pCGP1636 se liberó tras la digestión de pCGP1636 con las endonucleasas de restricción *Pst*I y *Eco*RI. Los extremos se repararon y el fragmento de ~2,6 kb se purificó y ligó con los extremos *Sam* del vector binario, pWTT2132 (DNAP). La inserción correcta del gen 35S 5': *petHf1: ocs 3'* en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección 35S 5': *SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido se designó pCGP1638 (Figura 13).

10 Transformación de plantas con pCG1638

El ADN-T contenido en el plásmido de vector binario pCGP1638 (Figura 13) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

15 El vector binario pCGP1860 (RoseCHS 5': *petHf1: nos 3'*)

20 El plásmido pCGP1860 (Figura 14) contiene un gen quimérico *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) bajo el control de un fragmento del promotor del gen chalcona sintasa de *Rosa hybrida* (*RoseCHS 5'*) con un fragmento del terminador del gen nopalina sintasa de *Agrobacterium* (*nos 3'*). El casete quimérico *F3'5'H* de petunia está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección 35S 5': *SuRB* del vector binario pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1860

25 Aislamiento del promotor *Rose CHS*

Se preparó una biblioteca de ADN genómico de rosa a partir de ADN genómico aislado de hojas jóvenes de *Rosa hybrida* cv. Kardinal.

30 La biblioteca de ADN genómico de Kardinal se seleccionó con fragmento marcado con ³²P del clon de ADNc de *CHS* de rosa contenido en el plásmido pCGP634. El clon de ADNc de *CHS* de rosa se aisló seleccionando una biblioteca de ADNc de pétalo preparada a partir de ARN aislado de pétalos de *Rosa hybrida* cv. Kardinal (Tanaka y col., 1995 arriba) usando un fragmento de ADNc de *CHS* de petunia como sonda (clon *1F11* contenido en pCGP701, descrito en Brugliera y col., 1994 arriba). Las condiciones son como se describen en Tanaka y col., 1995 (arriba).

35 Se eligió un clon genómico de rosa (*roseCHS20λ*) para el análisis posterior y se encontró que contenía ~6,4 kb de secuencia aguas arriba de la metionina de iniciación putativa de la región codificante de *CHS* de rosa.

40 Un fragmento de ~6,4 kb aguas arriba del sitio de iniciación de la traducción se clonó en pBluescript KS (-) (Stratagene) y el plásmido se designó pCGP1114.

45 El plásmido pCGP1114 se digirió con las endonucleasas de restricción *Hind*III y *Eco*RV para liberar un fragmento de 2,7-3,0 kb que se purificó y ligó con los extremos de *Hind*III/*Sma*I del pUC19 (New England Biolabs). La inserción correcta del fragmento del promotor *CHS* de rosa se estableció mediante el análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP116. La secuencia de ADN del fragmento del promotor *CHS* de rosa se determinó usando pCGP116 como molde (SEQ ID NO:5).

50 Construcción de pCGP197 (RoseCHS 5': *GUS: nos 3'* en esqueleto de pUC18)

55 Un fragmento de ~3,0 kb que contiene el promotor de chalcona sintasa de rosa (*RoseCHS 5'*) se liberó del plásmido pCGP116 tras la digestión con las endonucleasas de restricción *Hind*III y *Asp*718. El fragmento se purificó y ligó con un fragmento *Hind*III/*Asp*718 de pJB1 (Bodeau, 1994, arriba) que contenía el esqueleto del vector, β-glucuronidasa (*GUS*) y fragmentos *nos 3'*. La inserción correcta del fragmento del promotor *CHS* de rosa aguas arriba de la secuencia codificante de *GUS* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP197.

Construcción de pCGP200 (RoseCHS 5': *petHf1: nos 3'* en esqueleto de pUC18)

60 Un fragmento de 1,8 kb que contiene el fragmento de *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) se liberó del plásmido pCGP1303 (descrito anteriormente) (Figura 4) tras la digestión con endonucleasas de restricción *Bsp*HI y *Sac*I. El fragmento de *F3'5'H* de petunia *petHf1* se purificó y ligó con los extremos *Nco*I/*Sac*I de pCGP197. La inserción correcta del fragmento de *F3'5'H* de petunia *petHf1* entre el promotor *CHS* de rosa y los fragmentos *nos 3'* se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante fue designado como pCGP200.

65

Construcción de pCG1860 (RoseCHS 5': petHf1: nos 3' en un vector binario)

Un fragmento de ~4,9 kb que contenía el casete *RoseCHS 5': petHf1: nos 3'* se liberó del plásmido pCGP200 tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Bgl*II. El fragmento se purificó y ligó con los extremos *Bam*HI del vector binario, pWTT2132 (DNAP) (Figura 6). La inserción correcta del fragmento en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* de pWTT2132 se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP1860 (Figura 13).

Transformación de plantas con pCGP1860

El ADN-T contenido en el plásmido de vector binario pCGP1860 (Figura 14) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP2123 (CaMV 35S: petHf2: ocs 3')

El plásmido pCGP2123 (Figura 15) contiene un gen quimérico *F3'5'H* de petunia (*petHf2*) bajo el control de un promotor *CaMV 35S* con un fragmento del terminador del gen octopina sintasa de *Agrobacterium* (*ocs 3'*). El casete quimérico *F3'5'H* de petunia está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario, pCGP1988 (Figura 16).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP2123Construcción de pCGP1988 (un derivado del vector binario, pWTT2132)

El vector binario pCGP1988 (Figura 16) se basa en el vector binario pWTT2132 (DNAP) (Figura 6) pero contiene el sitio de clonación múltiple de pNEB193 (The England Biolabs). El plásmido pNEB193 se linealizó inicialmente por digestión con la endonucleasa de restricción *Eco*RI. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento de clonación múltiple se liberó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Pst*I. El fragmento se purificó y ligó con los extremos reparados *Sa*II (extremos reparados)/*Pst*I del vector binario pWTT2132 (DNAP). La inserción correcta del fragmento de clonación múltiple en pWTT2132 se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP1988 (Figura 16).

Construcción de pCGP2000 (fragmento del promotor CaMV 35S en pBluescript)

El plásmido pCGP2000 fue un plásmido intermedio que contenía un fragmento del promotor *35S* del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) en un esqueleto de pBluescript SK (Stratagene, EE.UU.). El fragmento del promotor *CaMV 35S* de pKIWI101 (Janssen and Gardner 1989, arriba) se liberó tras la digestión con la endonucleasas de restricción *Xba*I y *Pst*I. El fragmento de ~0,35 kb generado se purificó y ligó con los extremos de *Xba*I/*Pst*I del vector pBluescript SK. La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido se designó pCGP2000.

Construcción de pCGP2105 (fragmentos CaMV 35S 5' y ocs 3' en pBluescript)

El plásmido pCGP2105 (Figura 17) contenía un fragmento del promotor *CaMV 35S* junto con un fragmento del terminador del gen octopina sintasa de *Agrobacterium* (*ocs 3'*) ambos de pKIWI101 (Janssen y Gardner, 1989, arriba).

El fragmento *ocs 3'* de pKIWI101 (Janssen y Gardner, 1989, arriba) se aisló digiriendo primero el plásmido pKIWI101 con la endonucleasa de restricción *Eco*RI, seguido por reparación de los extremos de nucleótidos protuberantes, y finalmente por digestión con la endonucleasa de restricción *Xho*I para liberar un fragmento de 1,6 kb. Este fragmento se ligó entonces con los extremos *Hinc*II/*Xho*I de pCGP2000. La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido se designó pCGP2105 (Figura 17).

Construcción de pCGP2109 (gen CaMV 35S: petHf2: ocs 3' en pBluescript)

El plásmido pCGP2109 contenía el casete del gen de expresión *CaMV 35S: petHf2: ocs 3'* en un esqueleto de pBluescript.

El clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf2* de 1,8 kb se liberó de pCGP175 (Holton y col., 1993, arriba) tras la digestión con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Ssp*I. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento purificado se ligó con los extremos *Pst*I (extremos reparados/*Eco*RV de pCGP2105 (descrito anteriormente) (Figura 17). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de

restricción de ARN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido se designó pCGP2109.

Construcción de pCGP2123 (vector binario CaMV 35S: petHf2: ocs 3')

El casete *CaMV 35S: petHf2: ocs 3'* se liberó de pCGP2109 tras la digestión con las endonucleasas de restricción *Asp718* y *XbaI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento resultante de ~3,7 kb que contenía el gen *CaMV 35S: petHf2: ocs 3'* se purificó y ligó con los extremos reparados de *Asp718* del vector binario, pCGP1988 (Figura 16). La inserción correcta del gen *CaMV 35S: petHf2: ocs 3'* en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido a partir de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido se designó pCGP2123 (Figura 15).

Transformación de plantas con pCGP2123

El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP2123 (Figura 15) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

Ejemplo 5

Análisis de rosas transgénicas

Las rosas transgénicas producidas en los experimentos descritos en el Ejemplo 4 se cultivaron hasta su floración. Las flores se recolectaron y los colores de los pétalos se codificaron usando las cartas de colores de la Real Sociedad Hortícola (RHSCC). Las antocianinas se extrajeron y las antocianidinas (específicamente la presencia de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina) se analizaron por análisis por CCF y/o HPLC. El ARN total también se aisló de tejido de pétalo y se usó análisis de transferencia Northern para detectar transcritos de transgenes *F3'5'H* de petunia, el gen *CHS* endógeno de rosa y el transgén *SuRB*. Los resultados de los análisis transgénicos se resumen en la Tabla 6.

Aunque se produjeron más de 250 rosas transgénicas Kardinal (Tabla 6), ninguna produjo flores con un cambio de color. Los análisis por CCF y/o HPLC fracasaron en detectar la acumulación de pigmentos de moléculas de delfinidina o basados en delfinidina confirmando la ausencia de una actividad de *F3'5'H* eficaz. El posterior análisis por Northern sobre ARN total aislado de tejido de pétalo de estas rosas transgénicas reveló que ni había transcritos *F3'5'H* de petunia (*petHf1* o *petHf2*) intactos ni, en algunos casos (véanse las notas a pie de página), transcritos degradados. La hibridación de las mismas membranas con el gen marcador de selección (*SuRB*) o con una sonda de ADNc de *CHS* de rosa endógena reveló transcritos de hibridación discretos que indicaron que no se había degradado el ARN total aislado. La detección de los transcritos del transgén *SuRB* confirmó que las rosas eran transgénicas.

TABLA 6: Resultados del análisis transgénico de pétalos de rosa transformados con el ADN-T de diversos casetes de expresión del gen *F3'5'H* de petunia (*petHf1* o *petHf2*)

PLÁSMIDO	GEN <i>F3'5'H</i>	EVENTOS	DEL	ARN
pCGP1452	<i>AmCHS 5': petHf1: petD8 3'</i>	34	0/28	0/34 ¹
pCGP1453	<i>Mac: petHf1: mas 3'</i>	16	0/14	0/13 ²
pCGP1457	<i>petD8 5': petHf1: petD8 3'</i>	11	0/11	0/11
pCGP1461	<i>short petFLS 5': petHf1: petFLS 3'</i>	11	0/11	0/11
pCGP1616	<i>petRT 5': petHf1: nos 3'</i>	4	0/4	0/4
pCGP1623	<i>mas/35S: petHf1: ocs 3'</i>	27	0/20	0/12 ³
pCGP1638	<i>CaMV 35S: petHf1: ocs 3'</i>	22	0/14	0/14
pCGP1860	<i>RosaCHS 5': petHf1: nos 3'</i>	15	0/13	0/13
pCGP2123	<i>CaMV 35S: petHf2: ocs 3'</i>	40	0/26	0/10

EVENTOS = número de eventos transgénicos independientes producidos

DEL = número de eventos transgénicos en los que se detectaron moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina (por CCF o HPLC) en pétalos con respecto al número total de eventos analizados

ARN = número de eventos transgénicos en los que se detectaron transcritos de *F3'5'H* (*petHf1* o *petHf2*) intactos mediante análisis de transferencia Northern en ARN total aislado de pétalos de rosa con respecto al número total de eventos analizados

¹ = Se detectaron transcritos degradados en 5 de los 34 analizados

² = Se detectaron transcritos degradados en 8 de los 13 analizados

³ = Se detectaron transcritos degradados en 8 de los 12 analizados

El hecho de que nunca se detectaran transcritos de F3'5'H de petunia (*petHf1* o *petHf2*) en pétalos de rosas transgénicas transformadas con los ADN-T descritos (Tabla 6) sugirió varias posibilidades:

- 5 1. que el ARN aislado se había degradado. Este no fue el caso puesto que el ARN se había teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. Las bandas de ARN ribosómico visibles intactas se usaron como indicador de la cantidad del ARN aislado. Adicionalmente, la detección de transcritos de longitud larga de los transgenes *CHS* de rosa y *SuRB* endógenos confirmó que la preparación de ARN no se había degradado.
- 10 2. que no hubo iniciación de la transcripción de los genes quiméricos *F3'5'H* evaluados. Esto era una posibilidad con algunos de los casetes de expresión analizados, puesto que no se detectaron transcritos de *F3'5'H* por análisis Northern. Sin embargo, todos los casetes de expresión de *F3'5'H* de petunia habían demostrado ser funcionales (es decir, producen un transcrito intacto y producen la producción de pigmentos basados en delphinidina) en otras plantas tales como clavel y petunia.
- 15 3. que los ARNm de *F3'5'H* de petunia *petHf1* y *petHf2* fueron inestables en rosas. Esto también era una posibilidad puesto que se detectaron transcritos de *F3'5'H* de petunia degradados por análisis Northern en ARN total aislado de pétalos de algunos eventos. Sin embargo, los ARNm de *petHf1* y *petHf2* de petunia habían demostrado ser estables en otras plantas tales como clavel y petunia. Tal inestabilidad podría deberse a una traducción aberrante que conduce a reposición de ARNm, alguna característica de la secuencia inherentemente inestable en células de rosa, algún otro factor o factores.
- 20 Por tanto, hubo una necesidad de encontrar fragmentos de promotor adecuados que condujeran eficazmente a la expresión de genes en pétalos de rosa y encontraran secuencias de *F3'5'H* adecuadas que produjeran transcritos intactos que se acumulan en pétalos de rosa conduciendo a actividad de *F3'5'H* funcional y a la producción de pigmentos basados en delphinidina.
- 25

30 Ejemplo 6

Evaluación de promotores en rosas

Desarrollo de casetes de expresión del gen GUS

35 La evaluación de los fragmentos de promotor y terminador se llevó a cabo usando el gen indicador GUS. Por tanto, varios promotores se ligaron al gen indicador β-glucuronidasa (*GUS*) (Jefferson y col., 1987, arriba) y se introdujeron en rosas en un intento por identificar los casetes de expresión que conducen a la iniciación eficaz de la transcripción en flores de rosa).

40 En la Tabla 7 se facilita un resumen de los fragmentos de promotor y terminador evaluados.

TABLA 7: Lista de casetes de expresión del gen quimérico *GUS* evaluados en rosas

PLÁSMIDO	CASETE DE EXPRESIÓN DE <i>GUS</i>	GEN DEL MARCADOR DE SELECCIÓN	VECTOR DE ESQUELETO
pCGP1307	<i>petD8 5': GUS: petD8 3'</i>	<i>mas 5': nptII: mas 3'</i>	pCGN1548
pCGP1506	<i>long petFLS 5': GUS: petFLS 3'</i>	<i>nos 5': nptII: nos 3'</i>	pBIN19
pCGP1626	<i>chrysCHS 5': GUS: petRT 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>	pWTT2132
pCGP1641	<i>petRT 5': GUS: petRT 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>	pWTT2132
pCGP1861	<i>RosaCHS 5': GUS: nos 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>	pWTT2132
pCGP1953	<i>AmCHS 5': GUS: petD8 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>	pWTT2132
pWTT2084	<i>35S 5': GUS: ocs 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>	pWTT2132

45 El vector binario pCGP1307 (*petD8 5': GUS: petD8 3'*)

El plásmido pCGP1307 (Figura 18) contiene un gen quimérico *GUS* bajo el control de un fragmento del promotor y terminador del gen *PLTP* de petunia (*petD8 5'* y *petD8 3'*, respectivamente). El casete del gen indicador quimérico *GUS* está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *mas 5': nptII: mas 3'* del vector binario pCGN1548 (McBride y Summerfelt, 1990, arriba).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1307

El fragmento *nos 3'* de pCGP1101 (véase el Ejemplo 4) se sustituyó con el fragmento *petD8 3'* de 0,75 kb (Holton, 1992, arriba) para producir el plásmido pCGP1106 que contenía un casete de expresión *petD8 5': GUS petD8 3'*.

5 El fragmento de 5,3 kb que contenía el casete de expresión *petD8 5': GUS: petD8 3'* se liberó del plásmido pCGP1106 tras la digestión con las endonucleasas de restricción *Hind III* y *PstI*. El fragmento se purificó y ligó con los extremos *HindIII/PstI* del vector binario pCGN1548 (McBride y Summerfelt, 1990, arriba). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la gentamicina. El plásmido resultante se designó pCGP1307 (Figura 18).

10

Transformación de plantas con pCGP1307

El ADN-T contenido en el plásmido de vector binario pCGP1307 (Figura 18) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

15

El vector binario pCGP1506 (long *petFLS 5': GUS: petFLS 3'*)

El plásmido pCGP1506 (Figura 19) contiene un gen quimérico *GUS* bajo el control de fragmentos del promotor y terminador del gen flavonol sintasa de petunia (*petFLS 5'* y *petFLS 3'*, respectivamente). El casete del gen indicador quimérico *GUS* está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *nos 5': nptII: nos 3'* del vector binario pBIN19 (Bevan, *Nucleic Acids Res* 12: 8711-8721, 1984).

20

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1506

25 Un fragmento del promotor *FLS* de petunia de 4 kb de longitud aguas arriba del sitio de iniciación de la traducción putativo se liberó del plásmido pCGP486 (descrito en el Ejemplo 4) tras la digestión con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *PstI*. El fragmento generado se purificó y ligó con los extremos *XhoI/PstI* de pBluescript II KS+ (Stratagene, EE.UU.). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción del ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP715.

30

Construcción de pCGP494 (casete de expresión long *petFLS 5': petFLS3'*)

35 Se amplificó por PCR un fragmento de 4,0 kb que contenía el fragmento del promotor *FLS* de petunia largo usando el plásmido pCGP715 como molde y el cebador T3 (Stratagene, EE.UU.) y un cebador *FLS-Nco* (5' AAA ATC GAT ACC ATG GTC TTT TTT TCT TTG TCT ATA C 3') (SEQ ID NO:19). El producto de PCR se digirió con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *Clal* y el fragmento purificado se ligó con los extremos *XhoI/Clal* de pCGP716 (descrito en el Ejemplo 4). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP494.

40

Construcción de pCGP496 (casete de expresión long *petFLS 5': GUS: petFLS3'*)

45 La secuencia codificante de *GUS* del plásmido pJB1 (Bodeau, 1994, arriba) se liberó tras la digestión con las endonucleasas de restricción *NcoI* y *SmaI*. El fragmento *GUS* generado se purificó y ligó con los extremos *Clal* (extremo reparados)/*NcoI* del plásmido pCGP494. La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP496.

50

Construcción de pCGP1506 (vector binario long *petFLS 5': GUS: petFLS3'*)

El plásmido pCGP496 se linealizó inicialmente tras la digestión con la endonucleasa de restricción *XhoI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon parcialmente (usando solamente dTTP y dCTP en la reacción de reparación) y se liberó un fragmento de 6,7 kb que contenía el casete de expresión del gen long *petFLS 5': GUS: petFLS 3'* tras la digestión con la endonucleasa de restricción *SacI*. El fragmento generado se purificó y ligó con los extremos *BamHI* (extremos parcialmente reparados usando dGTP y dATP en la reacción de reparación)/*SacI* del vector binario pBIN19. La inserción correcta del fragmento en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *nos 5': nptII: nos 3'* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la kanamicina. El plásmido resultante se designó pCGP1506 (Figura 19).

55

60

Transformación de plantas con pCGP1506

El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP1506 (Figura 19) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

65

El vector binario pCGP1626 (*chrysCHS* 5': *GUS*: *petRT* 3')

5 El plásmido pCGP1626 (Figura 20) contiene un gen quimérico *GUS* bajo el control del fragmento del promotor del gen chalcona sintasa de crisantemo (*chrysCHS* 5') y un fragmento del terminador del gen *3RT* de petunia (*petRT* 3') (Brugliera, 1994, arriba). El casete del gen indicador quimérico *GUS* está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S* 5': *SuRB* del vector binario pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1626

10 Aislamiento del promotor *CHS* de crisantemo

Se preparó una biblioteca de ADN genómico de crisantemo a partir de ADN genómico aislado de material de hojas jóvenes del *Chrysanthemum* cv. Hero.

15 La biblioteca de ADN genómico de crisantemo se seleccionó con fragmentos marcador con ³²P de un clon de ADNc de *CHS* de crisantemo (SEQ ID NO:28) (contenido en el plásmido pCGP856) usando condiciones de rigurosidad alta. El plásmido pCGP856 contiene un clon de ADNc de 1,5 kb de *CHS* aislado de una biblioteca de ADNc de pétalo de ARN aislado de *Chrysanthemum* cv. Dark Pink Pom Pom.

20 Se eligió un clon genómico (*CHS5*) para el posterior análisis y se encontró que contenía ~3 kb de secuencia aguas arriba de la metionina de iniciación putativa de la región codificante de *CHS* de crisantemo.

25 Se liberó un fragmento de 4 kb tras la digestión del clon genómico *CHS5* con la endonucleasa de restricción *Hind*III. El fragmento que contenía el promotor *CHS* de crisantemo se purificó y ligó con los extremos *Hind*III de pBluescript SK (Stratagene, EE.UU.). La correcta inserción del fragmento se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP1316.

30 Un fragmento del promotor *CHS* de crisantemo de 2,6 kb aguas arriba del sitio de iniciación de la traducción putativo fue se amplificó por PCR usando pCGP1316 como molde y los cebadores "chrysanCHSATG" (5'-GTTAAGGAAGCCATGGGTGT-3') (SEQ ID NO:8) y el cebador inverso M13 (Stratagene, EE.UU.). El cebador "chrysanCHSATG" incorporó una secuencia de reconocimiento de endonucleasas de restricción *Nco*I en el punto de iniciación de la traducción putativo para facilitar la clonación. El fragmento de PCR se purificó y ligó con los extremos *Eco*RV (con colas dT) de pBluescript KS (Holton y Graham, *Nuc. Acids Res.* 19: 1156, 1990). La correcta inserción del fragmento se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP1620. La secuencia de nucleótidos del fragmento del promotor *CHS* de crisantemo de contenido en pCGP1620 se representa SEQ ID NO:30.

Construcción de pCGP1622 (*chrysCHS* 5': *GUS*: *nos* 3' en esqueleto de pUC)

40 Un fragmento de ~2,5 kb que contenía el promotor *CHS* de crisantemo se liberó del plásmido pCGP1620 tras la digestión con las endonucleasas de restricción *Nco*I y *Pst*I. El fragmento se purificó y ligó con un fragmento de *Nco*I/*Pst*I de 4,8 kb de pJB1 (Bodeau, 1994, arriba) que contenía el vector de esqueleto con los fragmentos *GUS* y *nos* 3'. La correcta inserción del fragmento se estableció mediante análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP1622.

Construcción de pCGP1626 (*chrysCHS* 5': *GUS*: *nos* 3' en vector binario)

50 Un fragmento de ~4,6 kb que contenía el casete *chrysCHS* 5': *GUS*: *nos* 3' se liberó del plásmido pCGP1622 tras la digestión con las endonucleasas de restricción *Pst*I y *Bgl*II. El fragmento se purificó y ligó con los extremos *Pst*I/*Bam*HI del vector binario pWTT2132 (DNAP) (Figura 6). La correcta inserción del casete en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S* 5': *SuRB* se estableció con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP1626 (Figura 20).

Transformación de plantas con pCGP1626

60 El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP1626 (Figura 20) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP1641 (*petRT* 5': *GUS*: *petRT* 3')

65 El plásmido pCGP1641 (Figura 21) contiene un gen quimérico *GUS* bajo el control de un promotor *3RT* de petunia (*petRT* 5') que cubre 1,1 kb aguas arriba del codón de iniciación de la traducción *3RT* putativo con un terminador *3RT* de petunia (*petRT* 3') que cubre 2,5 kb aguas abajo del codón de terminación de *3RT*. El casete quimérico de *GUS* está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S* 5': *SuRB* del

vector binario, pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1641

5 Aislamiento del gen 3RT de petunia

El aislamiento del gen 3RT de petunia correspondiente al sitio *Rt* de *P. hybrida* se ha descrito en Brugliera, 1994, arriba.

10 Construcción de pCGP1625 (casete CaMV 35S: GUS: petRT 3')

El plásmido intermedio pCGP1625 contiene un casete *CaMV 35S: GUS: petRT 3'* en un esqueleto de pUC. El fragmento de 2,5 kb que contenía una secuencia de terminación *petRT* se liberó del plásmido pCGP1610 (descrito en Brugliera, 1994, arriba) tras la digestión con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Sac*I. El fragmento se purificó y ligó con el fragmento *Bgl*II/*Sac*I de 4,9 kb de pJB1 (Bodeau, 1994, arriba) que contenía el esqueleto de vector y el promotor *CaMV 35S* y fragmentos *GUS*. La inserción correcta del fragmento del terminador 3RT de petunia aguas abajo del fragmento *GUS* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP1625.

20 Construcción de pCGP1628 (casete petRT 5': GUS: petRT 3')

Un fragmento del promotor *petRT* de 1,1 kb se liberó del plásmido pCGP1611 (descrito en Brugliera, 1994, arriba) tras digestión con las endonucleasas de restricción *Nco*I y *Pst*I. El fragmento purificado se ligó con los extremos *Nco*I/*Pst*I del fragmento de 7 kb de pCGP1625 que contenía el vector de esqueleto y los fragmentos *GUS* y *petRT 3'*. La inserción correcta del fragmento del promotor *petRT* aguas arriba del fragmento *GUS* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP1628.

30 Construcción de pCGP1641 (vector binario petRT 5': GUS: petRT 3')

Un fragmento de 5,4 kb que contenía el casete *petRT 5': GUS: petRT 3'* se liberó de pCGP1628 tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Pst*I. El fragmento se purificó y ligó con los extremos *Pst*I del vector binario pWTT2132 (DNAP) (Figura 6). La inserción correcta del fragmento en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP1641 (Figura 21).

Transformación de plantas con pCGP1641

40 El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP1641 (Figura 21) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP1861 (RoseCHS 5': GUS: nos 3')

45 El plásmido pCGP1861 (Figura 22) contiene un gen quimérico *GUS* bajo el control de un fragmento del promotor del gen *CHS* de *R. hybrida* (*RoseCHS 5'*) con un fragmento del terminador del gen *nos* de *Agrobacterium* (*nos 3'*). El casete del gen indicador quimérico *GUS* está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario, pWTT2132 (Figura 6).

50 Un fragmento de ~5 kb que contenía el casete *RoseCHS 5': GUS: nos 3'* se liberó de pCGP197 (descrito en el Ejemplo 4) tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Bgl*II. El fragmento se purificó y ligó con los extremos *Bam*HI del vector binario, pWTT2132 (DNAP). La inserción correcta del fragmento en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP1861 (Figura 22).

Transformación de plantas con pCGP1861

60 El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP1861 (Figura 22) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP1953 (AmCHS 5': GUS: petD8 3')

65 El plásmido pCGP1953 (Figura 23) contiene un gen quimérico *GUS* bajo el control de un fragmento del promotor del gen *CHS* de *Antirrhinum majus* (*AmCHS 5'*) con un terminador *PLTP* de petunia (*petD8 3'*). El casete del gen indicador quimérico *GUS* está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección

35S 5': *SuRB* del vector binario, pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1953

5 El plásmido pJB1 (Bodeau, 1994, arriba) se linealizó con la endonucleasa de restricción *NcoI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento *GUS* de 1,8 kb se liberó tras la digestión con *BamHI*. El fragmento *GUS* se purificó y se ligó con el fragmento *XbaI* (extremos reparados)/*BamHI* de 5 kb de pCGP726 que contenía el vector de esqueleto pBluescript y los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* (descritos en el Ejemplo 4). La inserción correcta del fragmento *GUS* entre los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido se designó pCGP1952.

15 Un fragmento de 3,8 kb que contenía el casete de expresión *AmCHS 5': GUS: petD8 3'* se liberó del plásmido pCGP1952 tras la digestión con las endonucleasas de restricción *EagI* y *PstI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento purificado se ligó con los extremos reparados de un vector binario pWTT2132 digerido con *Asp718* (Figura 6). La inserción correcta del fragmento en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido se designó pCGP1953 (Figura 23).

20 Transformación de plantas con pCGP1953

5 El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP1953 (Figura 23) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

25 El vector binario pWTT2084 (35S 5': GUS: ocs 3')

30 El plásmido pWTT2084 (DNAP) (Figura 24) contiene un gen quimérico *GUS* bajo el control de un promotor *CaMV 35S* (35S 5') con un terminador de octopina sintasa (*ocs 3'*). Una secuencia conductora no traducida en 5' de ~60 pb del gen de la proteína de unión a clorofila a/b de petunia (gen *Cab 22*) (Harpster y col., 1988, arriba) se incluye entre el fragmento del promotor *CaMV 35S* y el clon *GUS*. El casete quimérico de *GUS* está en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario, pWTT2084.

35 Transformación de plantas con pWTT2084

El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pWTT2084 (Figura 24) se introdujo en rosa mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

40 Análisis transgénico de las rosas transformadas con los casetes de expresión de GUS

Se realizó análisis de transferencia Northern sobre el ARN total aislado de pétalos de las etapas de desarrollo 3 a 4 de rosas Kardinal transgénicas transformadas con el ADN-T de diversos casetes de expresión de *GUS*. No hubo ni acumulación de transcrito ni un transcrito de longitud completa intacto del tamaño esperado de ~1,8 kb como se detectó por hibridación de transferencia Northern. Se registraron los niveles relativos de transcritos de *GUS* que se acumularon en los pétalos de rosa (véase la Tabla 8).

TABLA 8: Resumen de análisis Northern de flores de rosa Kardinal transgénica (etapa de yema abierta) que contienen construcciones de *GUS*

PLÁSMIDO	GEN INDICADOR <i>GUS</i>	GEN DEL MARCADOR DE SELECCIÓN	NIVELES DE TRANSCRITO DE <i>GUS</i>
pCGP1307	<i>petD8 5': GUS: petD8 3'</i>	<i>mas 5': nptII :mas 3'</i>	-
pCGP1506	<i>petFLS 5': GUS: petFLS 3'</i>	<i>nos 5': nptII: nos 3'</i>	-
pCGP1626	<i>chrysCHS 5': GUS: petRT 3'</i>	<i>35S 5 SuRB</i>	++ a +++
pCGP1641	<i>petRT 5': GUS: petRT 3'</i>	<i>35S 5 SuRB</i>	-
pCGP1861	<i>RosaCHS 5': GUS: nos 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>	++++
pCGP1953	<i>AmCHS 5': GUS: petD8 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>	-
pWTT2084	<i>35S 5': GUS: ocs 3'</i>	<i>35S 5': SuRB</i>	+++++

- = no se detectan transcritos

50 + a +++++ = niveles relativos (bajos a altos) de transcrito *GUS* de longitud completa detectado por análisis de transferencia Northern

Basándose en los resultados anteriores (Tabla 8), los promotores *CaMV 35S* (*35S 5'*) y *CHS* de rosa (*RoseCHS 5'*) parecen conducir a niveles relativamente altos de transcripción en pétalos de rosa. El promotor *CHS* de crisantemo (*chrysCHS 5'*) parece también conducir a altos niveles de transcripción, pero no tan altos como aquellos obtenidos usando promotores *CaMV 35S* o *CHS* de rosa. Sorprendentemente, no pareció que los promotores *CHS* de *Antirrhinum* (boca de dragón) (*AmCHS 5'*), *3RT* de petunia (*petRT 5'*), *FLS* de petunia (*petFLS 5'*) y *PLTP* de petunia (*petD8 5'*) funcionaran en pétalos de rosa, ya que no se detectaron transcritos *GUS* con casetes de expresión que incorporaban estos promotores. Sin embargo, previamente se había demostrado que estos mismos promotores fusionados con genes *petHf1* y/o *GUS* funcionaban bien en clavel y petunia conduciendo a niveles de transcrito de longitud completa relativamente altos y, para genes *petHf1*, la producción de pigmentos de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina. El resultado obtenido con el promotor *CHS* de *Antirrhinum* (*AmCHS 5'*) fusionado con el gen *GUS* fue más sorprendente, ya que pareció que las regiones de promotores de genes homólogos de otras dos especies (rosa y crisantemo) funcionaban relativamente bien en rosas. El promotor *CHS* de *Antirrhinum* también se había usado satisfactoriamente junto con *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) para producir los novedosos claveles de color violeta Florigene Moondust (véase la solicitud de patente internacional nº PCT/AU96/00296).

La evaluación de los fragmentos de promotor y terminador fusionados con el gen *GUS* también proporcionó más pruebas que sugirieron que las secuencias de *F3'5'H* de petunia *petHf1* y *petHf2* eran inestables en rosas ya que las construcciones que contenían las secuencias de *F3'5'H* de petunia ligadas a los promotores *CaMV 35S*, *CHS* de rosa y *CHS* de crisantemo (que funcionan en rosa) no produjeron transcritos de *F3'5'H* de petunia *petHf1* o *petHf2* intactos en rosas (véase la Tabla 6).

Ejemplo 7

Aislamiento de secuencias de F3'5'H de especies diferentes de petunia

Como ya se había probado que las secuencias de *F3'5'H* de petunia funcionaban en diversas plantas tales como clavel, petunia y tabaco, y finalmente produjeron la producción de pigmentos basados en delfinidina, era razonable asumir que estas secuencias también demostrarían ser funcionales en rosas. Se asumió que la actividad enzimática podía variar dependiendo del antecedente de la especie, de hecho entre cultivares de una especie dada, en el que se introdujo la *F3'5'H* de petunia. Sin embargo, no había esperanzas de que el ARNm de *F3'5'H* de petunia recombinante de longitud completa no se acumulara. El análisis de las secuencias de nucleótidos de *F3'5'H* de petunia (*petHf1* y *petHf2*) no reveló ninguna secuencia que pudiera conducir a inestabilidad y posterior degradación (Johnson y col., en *A look beyond transcription*, ASPP, USA, Bailey-Serres and Gallie, eds, 1998), límites de corte y empalme intrón: exón (Brendel y col., en *A look beyond transcription*, ASPP, USA, Bailey-Serres and Gallie, eds, 1998), o cualquier secuencia autocatalítica o desencadenante de la degradación informada en la bibliografía científica hasta la fecha (en *A look beyond transcription*, ASPP, USA, Bailey-Serres and Gallie, eds, 1998). El sorprendente resultado sugirió que había factores específicos para la rosa que produjeron que las secuencias de *F3'5'H* de petunia fueran inestables.

Como no era obvio por qué las secuencias de *F3'5'H* de petunia eran inestables en rosas pero estables en clavel, petunia o tabaco, se aislaron varias secuencias de *F3'5'H* a lo largo de una gama de familias en un intento por determinar si cualquier secuencia de *F3'5'H* era inestable o no en rosas y luego identificar cualquier secuencia de *F3'5'H* que condujera a la síntesis de transcritos de *F3'5'H* estables y a actividad de *F3'5'H* y finalmente a la producción de pigmentos basados en delfinidina en rosas conduciendo a un cambio en el color de la flor.

Construcción de bibliotecas de ADNc de pétalo

Se prepararon bibliotecas de ADNc de pétalo a partir de ARN aislado de pétalos de las etapas de yema a flor abierta a partir de diversas especies de plantas descritas en la Tabla 9. *Rosa hybrida* se clasifica en la familia Rosaceae, orden Rosales, subclase Rosidae y así se seleccionaron especies que producían pigmentos basados en delfinidina y así contenían una *F3'5'H* funcional y pertenecían a la subclase Rosidae. *Petunia hybrida* se clasifica en la familia Solanaceae, orden Solanales, subclase Asteridae y así se seleccionaron especies de la subclase Asteridae que producían pigmentos basados en delfinidina.

TABLA 9: Lista de flores a partir de las cuales se aisló ARN total para la preparación de bibliotecas de ADNc de pétalo. Información obtenida de la página web del Centro nacional para información biotecnológica (NCBI) en el buscador Taxonomía (TaxBrowser) a partir de agosto de 2003

FLOR	ESPECIE	FAMILIA	ORDEN	SUBCLASE
genciana	<i>Gentiana spp.</i>	Gentianaceae	Gentianales	Asteridae
lavanda	<i>Lavandula spp.</i>	Lamiaceae	Lamiales	Asteridae
salvia	<i>Salvia spp.</i>	Lamiaceae	Lamiales	Asteridae
Sollya	<i>Sollya spp.</i>	Pittosporaceae	Apiales	Asteridae

Kennedia	<i>Kennedia spp.</i>	Fabaceae	Fabales	Rosidae
campanilla	<i>Clitoria ternatea</i>	Fabaceae	Fabales	Rosidae
pensamiento	<i>Viola spp.</i>	Violaceae	Malpighiales	Rosidae

A menos que se describa otra cosa, el ARN total se aisló del tejido de pétalo de flores púrpura/azules usando el método de Turpen y Griffith (*BioTechniques* 4: 11-15, 1986). Se seleccionó poli (A)⁺ ARN del ARN total, usando oligotex-dT™ (Qiagen) o por tres ciclos de cromatografía en celulosa de oligo-dT (Aviv y Leder, *Proc. Natl. Acad. USA* 69: 1408,1972).

En general se utilizó el kit de clonación λZAPII/ Gigapack II (Stratagene, EE.UU.) (Short y col., *Nucl Acids Res.* 16: 7583-7600, 1988) para construir bibliotecas de ADNc de pétalo direccionales en ZAPII usando aproximadamente 5 µg de poli (A)⁺ ARN aislado de pétalo como molde. El número total de recombinantes obtenidos fue generalmente del orden de 1 x 10⁵ a 1 x 10⁶.

Después de transfectar células XL1-Blue MRF', las mezclas de ADNc envasadas se sembraron a aproximadamente 50.000 ufp por placa de 15 cm de diámetro. Las placas se incubaron a 37 °C durante 8 horas, y los fagos se eluyeron en NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, gelatina al 0,01% (p/v) (tampón de almacenamiento de fagos (PSB)) (Sambrook y col., 1989, arriba). Se añadió cloroformo y los fagos se almacenaron a 4 °C como bibliotecas amplificadas.

En general, aproximadamente 100.000 ufp de las bibliotecas amplificadas se sembraron sobre placas NZY (Sambrook y col., 1989, arriba) a una densidad de aproximadamente 10.000 ufp por placa de 15 cm después de transfectar las células XL1-Blue MRF', y se incubaron a 37 °C durante 8 horas. Después de la incubación a 4 °C durante la noche se tomaron elevaciones por duplicado sobre filtros Colony/Plaque Screen™ (DuPont) y se trataron como recomienda el fabricante.

Aislamiento de plásmidos

Se usó fago auxiliar R408 (Stratagene, EE.UU.) para escindir fagémidos pBluescript que contenían insertos de ADNc de bibliotecas de ADNc λZAPII o λZAP usando métodos descritos por el fabricante.

Selección de bibliotecas de ADNc de pétalo

Antes de la hibridación, elevaciones de placas por duplicado se lavaron en disolución de prelavado (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, NaCl 1 M, EDTA 1 mM, sarcosina al 0.1% (p/v)) a 65 °C durante 30 minutos; seguido por lavado en hidróxido sódico 0,4 M a 65 °C durante 30 minutos; luego se lavaron en una disolución de Tris-HCl 0,2 M a pH 8,0, 0,1 x SSC, SDS al 01% (p/v) a 65 °C durante 30 minutos y finalmente se aclararon en 2 x SSC, SDS al 1,0% (p/v).

Las elevaciones de membrana de las bibliotecas de ADNc de pétalo se hibridaron con fragmentos marcados con ³²P de un fragmento *BspHI/FspI* de 1,6 kb de pCGP602 (Figura 2) (SEC ID NO: 1) que contenía el clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1* (Holton y col., 1993a, arriba).

Las condiciones de hibridación incluyeron una etapa de prehibridación en formamida al 10% v/v, NaCl 1 M, sulfato de dextrano al 10% p/v, SDS al 1% p/v a 42 °C durante al menos 1 hora. Los fragmentos marcados con ³²P (cada uno a 1 x 10⁶ cpm/ml) se añadieron luego a la disolución de hibridación y la hibridación continuó a 42 °C durante 16 horas adicionales. Los filtros se lavaron entonces en 2 x SSC, SDS al 1% p/v a 42 °C durante 2 x 1 hora y se expusieron a una película Kodak XAR con una pantalla de intensificación a -70 °C durante 16 horas.

Las placas fuertemente hibridantes se recogieron en PSB (Sambrook y col., 1989, arriba) y se volvieron a seleccionar para aislar placas purificadas usando las condiciones de siembra e hibridación como se describen para la selección inicial de la biblioteca de ADNc. Los plásmidos contenidos en los vectores de bacteriófago λZAPII o λZAP se rescataron y se generaron datos de secuencia de los extremos 3' y 5' de los insertos de ADNc. Se identificaron nuevos clones de ADNc de *F3'5'H* basándose en la similitud de secuencias con el don de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1*.

A los clones de ADNc aislados se les dieron números de designación de plásmidos como se describe en la Tabla 10.

TABLA 10: Números de plásmidos y SEQ ID NO: de clones de ADNc de *F3'5'H* aislados a partir de diversas especies

ESPECIE	CLON	NÚMERO DE PLÁSMIDO	NÚMERO DE FIGURA	SEQ ID NO.
<i>Viola spp.</i>	BP#18	pCGP1959	25	9
<i>Viola spp.</i>	BP#40	pCGP1961	26	11

<i>Salvia spp.</i>	Sal#2	pCGP1995	31	13
<i>Salvia spp.</i>	Sal#47	pCGP1999	32	15
<i>Sollya spp.</i>	Soll#5	pCGP2110	37	17
<i>Kennedia spp.</i>	Kenn#31	pCGP2231	40	26
<i>Clitoria ternatea</i>	BpeaHF2	pBHF2F4	43	20
<i>Gentiana triflora</i>	Gen#48	pG48	47	22
<i>Lavandula nil</i>	LBG	pLHF8	51	31

Construcciones de F3'5'H de *Viola* (pensamiento)

Aislamiento de clones de ADNc de F3'5'H a partir de pétalos de *Viola spp.* (pensamiento)

5 Se aislaron ARN total y poli (A)⁺ ARN de pétalos de yemas jóvenes de *Viola spp.* cultivar pensamiento negro como se ha descrito anteriormente. Se construyó una biblioteca de ADNc de pétalo usando el kit de clonación λZAPII/ Gigapack II (Stratagene, EE.UU.) y se seleccionó como se ha descrito anteriormente. Se identificaron dos clones de
10 de ADNc de F3'5'H de pensamiento de longitud completa (BP#18 (SEQ ID NO:9) en pCGP1959 (Figura 25) y BP#40 (SEQ ID NO:11) en pCGP1961 (Figura 26)) por similitud de secuencias con el clon de ADNc de F3'5'H de petunia *petHf1* (SEQ ID NO:1). BP#18 y BP#40 compartieron el 82% de identidad al nivel de nucleótidos. La comparación de la secuencia de nucleótidos de los clones de F3'5'H de pensamiento (BP#18 y BP#40) con la de F3'5'H de petunia reveló aproximadamente el 60% de identidad con el clon de F3'5'H de petunia *petHf1* y el 62% de identidad con el
15 clon de F3'5'H de petunia *petHf2*.

Los vectores binarios, pCGP1972 y pCGP1973 (AmCHS 5': BP#18 o BP#40: petD8 3')

20 Los plásmidos pCGP1972 (Figura 27) y pCGP1973 (Figura 28) contienen el clon de ADNc de F3'5'H de pensamiento (BP#18 y BP#40, respectivamente) entre un fragmento del promotor *CHS* de *A. majus* (boca de dragón) *CHS* (*AmCHS* 5') y un fragmento del terminador *PLTP* de petunia (*petD8* 3'). Los genes quiméricos F3'5'H están en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección 35S 5': *SuRB* del vector binario, pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

25 El clon de ADNc de F3'5'H de petunia (*petHf1*) en pCGP725 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 7) se eliminó digiriendo inicialmente con pCGP725 con la endonucleasa de restricción *Bam*HI. Los extremos se repararon y el plásmido linealizado se digirió adicionalmente con la endonucleasa de restricción *Xba*I. El fragmento de ~4,9 kb que contenía el vector con los fragmentos *AmCHS* 5' y *petD8* 3' se purificó y ligó con el fragmento *Kpn*I (extremos reparados)/*Xba*I de ~1,6 kb que contenía el clon de ADNc de F3'5'H BP#18 o BP#40 de pensamiento de pCGP1959 o pCGP1961, respectivamente, para producir pCGP1970 y pCGP1971, respectivamente. El casete *AmCHS* 5':
30 *pansy* F3'5'H: *petD8* 3' se aisló entonces a partir de pCGP1970 o pCGP1971 digiriendo inicialmente con la endonucleasa de restricción *Not*I. Los extremos del plásmido linealizado se repararon y luego se liberaron los genes quiméricos F3'5'H tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Eco*RV. Los fragmentos purificados se ligaron entonces con *Asp*718 (extremos reparados) del vector binario pWTT2132 (DNAP). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. Los plásmidos resultantes se designaron pCGP1972 (Figura 27) y
35 pCGP1973. (Figura 28), respectivamente.

Transformación de clavel y petunia con pCGP1972 y 1973

40 Los ADN-T contenidos en los plásmidos de los vectores binarios pCGP1972 (Figura 27) y pCGP1973 (Figura 28) se introdujeron por separado en los *Dianthus caryophyllus* cultivares Kortina Chanel y Monte Lisa y *Petunia hybrida* cv. Skr4 x Sw63 mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

Los vectores binarios, pCGP1967 y pCGP1969 (CaMV 35S: pansy F3'5'H: ocs 3')

45 Los vectores binarios pCGP1967 (Figura 29) y pCGP1969 (Figura 30) contienen genes quiméricos *CaMV* 35S: *pansy* F3'5'H: *ocs* 3' en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección 35S 5': *SuRB* del vector binario, pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

50 Productos intermedios en la preparación de los vectores binarios pCGP1967 y pCGP1969

Los plásmidos pCGP1959 (Figura 25) y pCGP1961 (Figura 26) se linealizaron inicialmente tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Kpn*I. Los extremos de nucleótidos protuberantes *Kpn*I se repararon y los clones de ADNc de F3'5'H de pensamiento, BP#18 y BP#40, se liberaron tras la digestión con la endonucleasa de restricción

*Pst*I. Los fragmentos de ~1,6 kb generados se ligaron con un fragmento *Eco*RI (extremos reparados)/*Pst*I de ~5,9 kb de pKIWI101 (Janssen y Gardner, 1989, arriba). La correcta inserción de cada fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. Los plásmidos resultantes se designaron pCGP1965 y pCGP1966, respectivamente.

5 Los plásmidos pCGP1965 y pCGP1966 se digirieron inicialmente parcialmente con la endonucleasa de restricción *Xho*I. Los fragmentos resultantes se digirieron adicionalmente con la endonucleasa de restricción *Xba*I. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y los fragmentos de 3,6 kb que contenían los genes quiméricos *CaMV 35S: pansy F3'5'H: ocs 3'* se aislaron y ligaron con los extremos reparados *Asp*718 de pWTT2132 (Figura 6). La correcta inserción de cada fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. Los plásmidos resultantes se designaron pCGP1967 (Figura 29) y pCGP1969 (Figura 30), respectivamente.

15 Transformación de rosa con pCGP1967 y pCGP1969

Los ADN-T contenidos en los plásmidos de los vectores binarios pCGP1967 (Figura 29) y pCGP1969 (Figura 31) se introdujeron por separado en *Rosa hybrida* cv. Kardinal y Soft Promise mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. El ADN-T contenido en los plásmidos de los vectores binarios pCGP1969 (Figura 31) también se introdujo en *Rosa hybrida* cv. Pamela y Medeo mediante transformación mediada por *Agrobacterium*,

20 Construcciones de F3'5'H de salvia

Aislamiento de un clon de ADNc de F3'5'H de pétalos de Salvia spp.

25 Se aislaron ARN total y poli (A)⁺ ARN de yemas de pétalos jóvenes de *Salvia spp.* (comprados en un vivero) como se ha descrito anteriormente. Se construyó una biblioteca de ADNc de pétalo usando el kit de clonación λZAPII/ Gigapack II (Stratagene, EE.UU.). Se identificaron dos clones de ADNc de F3'5'H de salvia de longitud completa (Sal#2 (SEQ ID NO:13) en pCGP1995 (Figura 31) y Sal#47 (SEQ ID NO:15) en pCGP1999 (Figura 32)) por similitud de secuencias con el clon de ADNc de F3'5'H de petunia *petHf1*. Sal#2 y Sal#47 comparten el 95% de identidad al nivel de nucleótidos. La comparación de la secuencia de nucleótidos de clones de F3'5'H de salvia (Sal#2 y Sal#47) con la de F3'5'H de petunia reveló aproximadamente el 57% de identidad con el clon de F3'5'H de petunia *petHf1* (SEQ ID NO:1) y el 58% de identidad con el clon F3'5'H de petunia *petHf2* (SEQ ID NO:3).

35 Los vectores binarios, pCGP2121 y pCGP2122 (AmCHS 5': Salvia F3'5'H #2 o #47: petD8 3')

Los plásmidos pCGP2121 (Figura 33) y pCGP2122 (Figura 34) contienen los clones de ADNc de F3'5'H de salvia (Sal#2 y Sal#47, respectivamente) entre un fragmento del promotor *CHS* de boca de dragón (*AmCHS 5'*) y un fragmento del terminador *PLTP* de petunia (*petD8 3'*) en tándem con el casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario pWTT2132 (DNAP) (Figura 6).

40 El clon de ADNc de F3'5'H de petunia (*petHf1*) en pCGP725 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 7) se eliminó digiriendo inicialmente con pCGP725 con la endonucleasa de restricción *Bam*HI. Los extremos se repararon y el plásmido linealizado se digirió adicionalmente con la endonucleasa de restricción *Xba*I. El fragmento de ~4,9 kb que contenía el vector con los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* se purificó y ligó con el fragmento *Xho*I/*Bam*HI (extremos reparados) de ~1,6 kb de pCGP1995 (Figura 31) que contenía el fragmento *F3'5'H#2* o *Xho*I/*Eco*RI (extremos reparados) de pCGP1999 de salvia (Figura 32) que contenía F3'5'H #47 de salvia, respectivamente para producir pCGP2116 y pCGP2117, respectivamente

50 El casete *AmCHS 5': salvia F3'5'H: petD8 3'* se aisló a partir de pCGP2116 o pCGP2117 digiriendo inicialmente con la endonucleasa de restricción *Not*I. Los extremos de los plásmidos linealizados se repararon y luego los casetes del gen quimérico *F3'5'H* se liberaron tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Eco*RV. Los fragmentos purificados de ~3,6 kb se ligaron entonces con los extremos *Asp*718 reparados del vector binario pCGP1988 (Figura 16) (descrito en el Ejemplo 4). La correcta inserción de cada fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. Los plásmidos resultantes se designaron pCGP2121 (Figura 33) y pCGP2122 (Figura 34), respectivamente.

Transformación de clavel y petunia con pCGP2121 y pCGP2122

60 Los ADN-T contenidos en los plásmidos de los vectores binarios pCGP2121 (Figura 33) y pCGP2122 (Figura 34) se introdujeron por separado en *Dianthus caryophyllus* cultivares Kortina Chanel y Monte Lisa y *Petunia hybrida* cv. Skr4 x Sw63 mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

Los vectores binarios, pCGP2120 y pCGP2119 (CaMV 35S: salvia F3'5'H: ocs 3')

65 Los vectores binarios pCGP2120 (Figura 35) y pCGP2119 (Figura 36) contienen casetes del gen quimérico *CaMV 35S: salvia F3'5'H: ocs 3'* en tándem con el casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario

pCGP1988 (Figura 16).

Productos intermedios en la preparación del vector binarios pCGP2120 y pCGP2119

5 Los plásmidos pCGP1995 (Figura 31) y pCGP1999 (Figura 32) se linealizaron inicialmente tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Xho*I. Los extremos de nucleótidos *Xho*I se repararon y los clones de ADNc de F3'5'H de salvia Sal#2 o Sal#47 se liberaron luego tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Eco*RI. En el caso de pCGP1995 se realizó una digestión parcial con *Eco*RI. Los fragmentos de ~1,7 kb se ligaron con los extremos *Cl*I (extremos reparados)/*Eco*RI de pCGP2105 (Figura 17). La correcta inserción de cada fragmento se estableció por
10 análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. Los plásmidos resultantes se designaron pCGP2112 y pCGP2111, respectivamente.

Los plásmidos pCGP2112 y pCGP2111 se digirieron con las endonucleasas de restricción *Xho*I y *Xba*I. Los extremos de nucleótidos protuberantes resultantes se repararon y los fragmentos de ~3,6 kb que contenían los genes quiméricos *CaMV 35S: salvia F3'5'H: ocs 3'* se aislaron y ligaron con los extremos *Asp*718 reparados del vector binario pCGP1988 (descrito en el Ejemplo 4). La correcta inserción de cada fragmento se estableció por
15 análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. Los plásmidos resultantes se designaron pCGP2120 (Figura 35) y pCGP2119 (Figura 36), respectivamente.

20 Transformación de rosa con pCGP2120 y pCGP2119

Los ADN-T contenidos en los plásmidos de los vectores binarios pCGP2120 (Figura 35) y pCGP2119 (Figura 36) se introdujeron por separado en *Rosa hybrida* cv. Kardinal mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

25 Construcciones de F3'5'H de Sollya

Aislamiento de un clon de ADNc de F3'5'H a partir de pétalos de Sollya spp.

30 Se aislaron ARN total y poli (A)⁺ ARN de yemas de pétalos jóvenes de *Sollya spp.* (comprados en un vivero) como se ha descrito anteriormente. Se construyó una biblioteca de ADNc de pétalo usando el kit de clonación λ ZAPII/Gigapack II (Stratagene, EE.UU.). Se identificó un clon de longitud completa de ADNc de F3'5'H de Sollya (Soll#5 (SEQ ID NO:17) en pCGP2110 (Figura 37)) por similitud de secuencias con el clon de ADNc de F3'5'H de petunia *petHf1*. La comparación de la secuencia de nucleótidos del clon de F3'5'H de Sollya con la de F3'5'H de petunia reveló aproximadamente el 48% de identidad con el clon de F3'5'H de petunia *petHf1* (SEQ ID NO:1) y el 52% de
35 identidad con el clon de F3'5'H de petunia *petHf2* (SEQ ID NO:3).

El vector binario pCGP2130 (*AmCHS 5': Sollya F3'5'H: petD8 3'*)

40 El plásmido pCGP2130 (Figura 38) contiene el clon de ADNc de F3'5'H de Sollya Soll#5 entre un fragmento del promotor *CHS* de boca de dragón (*AmGHS 5'*) y un fragmento del terminador *PLTP* de petunia (*petDB 3'*) en una orientación en tándem con respecto al casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario pCGP1988 (Figura 16).

45 El clon de ADNc de F3'5'H de petunia (*petHf1*) en pCGP725 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 7) se eliminó digiriendo inicialmente con pCGP725 con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Bam*HI. Los extremos se repararon el fragmento de ~4,9 kb que contenía el vector con los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* se purificó y ligó con los extremos reparados del fragmento *Asp*718/*Pst*I de ~1,6 kb de pCGP2110 que contenía el clon de ADNc de F3'5'H de Sollya para producir pCGP2128. La inserción correcta del fragmento de F3'5'H de Sollya en tándem con
50 los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* se confirmó por mapeo con endonucleasas de restricción.

El casete del gen *AmCHS 5': sollya F3'5'H: petD8 3'* se aisló entonces a partir de pCGP2128 digiriendo inicialmente con la endonucleasa de restricción *Not*I. Los extremos del plásmido linealizado se repararon y el gen quimérico F3'5'H se liberó entonces tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Eco*RV. El fragmento purificado de
55 ~3,5 kb se ligó entonces con *Asp*718 (extremos reparados) del vector binario pCGP1988 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 16). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP2130 (Figura 38).

60 Transformación de clavel y petunia con pCGP2130

El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP2130 (Figura 38) se introdujo en *Dianthus caryophyllus* cultivares Kortina Chanel y Monte Lisa y *Petunia hybrida* cv. Skr4 x Sw63 mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

65 El vector binario pCGP2131 (*CaMV 35S: sollya F3'5'H: ocs 3'*)

El vector binario pCGP2131 (Figura 39) contiene un gen quimérico *CaMV 35S: sollya F3'5'H: ocs 3'* en tándem con el casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario pCGP1988 (Figura 16).

5 Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP2131

El plásmido pCGP2110 se linealizó inicialmente tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Asp718*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el clon de ADNc de *F3'5'H* de Sollya se liberó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *PstI*. El fragmento de ~1,7 kb se ligó con los extremos *EcoRV/PstI* de pCGP2105 (Figura 17). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP2129.

Un fragmento de 3,6 kb que contenía el gen quimérico *CaMV 35S: sollya F3'5'H: ocs 3'* se liberó tras la digestión con las endonucleasas de restricción *Asp718* y *XbaI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento purificado se ligó con los extremos *Asp718* reparados del vector binario pCGP1988 (Figura 16). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP2131 (Figura 39).

20 Transformación de rosa con pCGP2131

El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP2131 (Figura 39) se introdujo en *Rosa hybrida cv. Kardinal* mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

Construcciones de *F3'5'H* de *Kennedia*

25 Aislamiento de un clon de ADNc de *F3'5'H* de pétalos de *Kennedia spp.*

Se aislaron ARN total y poli (A)⁺ ARN a partir de yemas de pétalos jóvenes de *Kennedia spp.* (compradas en un vivero) como se ha descrito anteriormente. Se construyó una biblioteca de ADNc de pétalo usando el kit de clonación λ ZAPII/ Gigapack II (Stratagene, EE.UU.). Se identificó un clon de ADNc de *F3'5'H* de *Kennedia* de longitud completa (Kenn#31 en pCGP2231 (Figura 40)) (SEQ ID NO:26) por similitud de secuencias con el clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1*. La comparación de la secuencia de nucleótidos del clon de *F3'5'H* de *Kennedia* con la de *F3'5'H* de petunia reveló aproximadamente el 64% de identidad con el clon de *F3'5'H* de petunia *petHf1* (SEQ ID NO:1) y el 60% de identidad con el clon de *F3'5'H* de petunia *petHf2* (SEQ ID NO:3).

35 El vector binario pCGP2256 (*AmCHS 5': Kennedia F3'5'H: petD8 3'*)

El plásmido pCGP2256 (Figura 41) contiene el clon de ADNc de *F3'5'H* de *Kennedia* (Kenn#31) entre un fragmento del promotor *CHS* de boca de dragón (*AmCHS 5'*) y un fragmento del terminador *PLTP* de petunia (*petD8 3'*) en tándem con el casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario pCGP1988 (Figura 16).

El clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) en pCGP725 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 7) se eliminó digiriendo inicialmente con pCGP725 con las endonucleasas de restricción *XbaI* y *BamHI*. Los extremos se repararon el fragmento de ~4,9 kb que contenía el vector con los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* se purificó y ligó con los extremos reparados de los fragmentos *XhoI/BamHI* de ~1,8 kb de pCGP2231 que contenía el clon de ADNc de *F3'5'H* de *Kennedia* para producir pCGP2242. La inserción correcta del fragmento de *F3'5'H* de *Kennedia* en tándem con los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* se confirmó mediante el mapeo con endonucleasas de restricción.

El casete *AmCHS 5': Kennedia F3'5'H: petD8 3'* se aisló entonces de pCGP2242 digiriendo con las endonucleasas de restricción *NotI* y *EcoRI*. Los extremos se repararon y el fragmento purificado de ~3,7 kb se ligó entonces con los extremos *Asp718* reparados del vector binario pCGP1988 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 16). La correcta inserción del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP2256 (Figura 41).

55 Transformación de petunia con pCGP2256

El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP2256 (Figura 41) se introdujo en *Petunia hybrida cv. Skr4 x Sw63* mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

60 El vector binario pCGP2252 (*CaMV 35S: Kennedia F3'5'H: ocs 3'*)

El vector binario pCGP2252 (Figura 42) contiene un gen quimérico *CaMV 35S: Kennedia F3'5'H: ocs 3'* en tándem con el casete marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario pCGP1988 (Figura 16).

65 Productos intermedio en la preparación del vector binario pCGP2252

El plásmido pCGP2231 se linealizó inicialmente tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Xho*I. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el clon de ADNc de *F3'5'H* de *Kennedia* se liberó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Pst*I. El fragmento de ~1,7 kb se ligó con los extremos *Cla*I (extremos reparados)/*Pst*I de pCGP2105 (Figura 17). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP2236.

Un fragmento de 3,6 kb que contenía el casete del gen quimérico *CaMV 35S: kennedia F3'5'H: ocs 3'* se liberó del plásmido pCGP2236 tras la digestión con las endonucleasas de restricción *Xho*I y *Not*I. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento purificado se ligó con los extremos *Asp*718 reparados del vector binario pCGP1988 (Figura 16). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP2252 (Figura 42).

Transformación de rosa con pCGP2252

El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP2252 (Figura 42) se introdujo en *Rosa hybrida* cv. Kardinal mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

Construcciones de F3'5'H de campanilla

Aislamiento de un clon de ADNc de F3'5'H de pétalos de Clitoria ternatea (campanilla)

Construcción de la biblioteca de ADNc de pétalo de campanilla

Una variedad azul de *Clitoria ternatea* (campanilla, las semillas fueron amablemente proporcionadas por el Jardín Botánico de Osaka) se cultivó en un campo en Osaka. El ARN total se aisló de pétalos frescos y pigmentados en la etapa de pre-antesis como se ha descrito anteriormente. Se preparó el poli A⁺ ARN usando Oligotex (Takara) según la recomendación del fabricante. Se construyó una biblioteca de ADNc de pétalo de campanilla a partir de poli A⁺ ARN usando un kit de síntesis de λZAP-ADNc direccional (Stratagene, EE.UU.) siguiendo los protocolos del fabricante.

Selección de una biblioteca de ADNc de campanilla para un clon de ADNc de F3'5'H

La biblioteca de ADNc de pétalo de campanilla se seleccionó con clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia *petHf1* marcado con DIG como se ha descrito previamente (Tanaka y col., *Plant Cell Physiol.* 37: 711-716, 1996). Se identificaron dos clones de ADNc que mostraron alta similitud de secuencias con la de *F3'5'H* de petunia *petHf1*. El plásmido que contenía el clon de ADNc más largo se designó pBHF2 y se secuenció el clon de ADNc. El alineamiento entre las secuencias de aminoácidos deducidas del clon de *F3'5'H* de campanilla y el clon de *F3'5'H* de petunia *petHf1* (SEQ ID NO:2) reveló que el ADNc de *F3'5'H* de campanilla (contenido en pBHF2) no representó un ADNc de longitud completa y careció de las 2 primeras bases del codón de iniciación putativo. Estas dos bases junto con un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción *Bam*HI se añadieron al clon de ADNc usando PCR y un cebador sintético, 5'-GGGATCCAACAATGTTCTTCTAAGAGAAAT-3' [SEQ ID NO:25] como se ha descrito previamente (Yonekura-Sakakibara y col., *Plant Cell Physiol.* 41: 495-502, 2000). El fragmento resultante se digirió con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Pst*I y se recuperó el fragmento de ADN posterior de aproximadamente 200 pb. El fragmento de ADN se ligó con un fragmento de 3,3 kb de pBHF2 digerido con *Bam*HI/*Eco*RI para producir pBHF2F (Figura 43). Se confirmó que la secuencia de ADN excluía errores cometidos durante la PCR (SEQ ID NO:20). La comparación de la secuencia de nucleótidos del clon de *F3'5'H* de campanilla (SEQ ID NO:20) con la de *F3'5'H* de petunia reveló aproximadamente el 59% de identidad con el clon de *F3'5'H* de petunia *petHf1* (SEQ ID NO:1) y el 62% de identidad con el clon de *F3'5'H* de petunia *petHf2* (SEQ ID NO:3).

El vector binario pCGP2135 (AmCHS 5': butterfly pea F3'5'H: petD8 3')

El plásmido pCGP2135 (Figura 44) contiene el clon de ADNc de *F3'5'H* de campanilla entre un fragmento del promotor *CHS* de boca de dragón (*AmCHS 5'*) y un fragmento del terminador *PLTP* de petunia (*petD8 3'*) en tándem con el casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario pCGP1988 (Figura 16).

El clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) en pCGP725 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 7) se eliminó digiriendo inicialmente con pCGP725 con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Bam*HI. Los extremos se repararon el fragmento de ~4,9 kb que contenía el vector con los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* se purificó y ligó con los extremos reparados del fragmento *Xho*I/*Bam*HI de ~1,6 kb de pBHF2F (Figura 43) que contenía el clon de ADNc de *F3'5'H* de campanilla para producir pCGP2133. La inserción correcta del fragmento de *F3'5'H* de campanilla en tándem con los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* se confirmó mediante el mapeo con endonucleasas de restricción.

El casete *AmCHS 5': butterfly pea F3'5'H: petD8 3'* se aisló entonces a partir de pCGP2133 digiriendo inicialmente

con la endonucleasa de restricción *NotI*. Los extremos del plásmido linealizado se repararon y el gen quimérico *F3'5'H* se liberó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *EcoRV*. El fragmento purificado de ~3,6 kb se ligó entonces con los extremos *Asp718* reparados del vector binario pCGP1988 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 16). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP2135 (Figura 44).

Transformación de clavel y petunia con pCGP2135

10 El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP2135 (Figura 44) se introdujo en *Dianthus caryophyllus* cultivares Kortina Chanel y Monte Lisa y *Petunia hybrida* cv. Skr4 x Sw63 mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pBEBF5 (eCaMV 35S: butterfly pea F3'5'H: nos 3')

15 El vector binario pBE2113-GUS contiene una región codificante *GUS* entre un promotor *CaMV 35S* potenciado y un terminador *nos* en un vector binario pBI121 (Mitsuhara y col., 1996, arriba). El plásmido pBE2113-GUS se digirió con la endonucleasa de restricción *SacI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y luego se ligaron con un ligador *Sall* para dar pBE2113-GUSs. El fragmento *BamHI-XhoI* de 1,8 kb de pBHF2F se ligó con pBE2113-GUSs digerido con *BamHI/Sall* para crear pBEBF5 (Figura 45).

Transformación de rosa con pBEBF5

25 El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pBEBF5 (Figura 45) se introdujo en *Rosa hybrida* cultivar lavanda mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP2134 (CaMV 35S: butterfly pea F3'5'H: ocs 3')

30 El vector binario pCGP2134 (Figura 46) contiene un casete del gen quimérico *CaMV 35S: butterfly pea F3'5'H: ocs 3'* en una orientación en tándem con el casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario pCGP1988 (Figura 16).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP2134

35 El clon de ADNc de *F3'5'H* de campanilla se liberó tras la digestión del plásmido pBHF2F (Figura 43) con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *BamHI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento de ~1,7 kb se ligó con los extremos *PstI* (extremos reparados)/*EcoRV* de pCGP2105 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 17). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP2132.

40 Un fragmento de ~3,6 kb que contenía el casete del gen quimérico *CaMV 35S: butterfly pea F3'5'H: ocs 3'* se liberó tras la digestión con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *XbaI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento purificado se ligó con los extremos *Asp718* reparados del vector binario pCGP1988 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 16). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP2134 (Figura 46).

Transformación de rosa con pCGP2134

50 El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP2134 (Figura 46) se introdujo en *Rosa hybrida* cv. Kardinal mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

Construcción de F3'5'H de genciana

55 Aislamiento de un clon de ADNc de F3'5'H de pétalos de *Gentiana triflora* (genciana)

Construcción y selección de una biblioteca de ADNc de pétalo de genciana

60 El aislamiento de un ADNc de genciana que codifica *F3'5'H* ha sido descrito previamente (Tanaka y col., 1996, arriba) y está contenido dentro del plásmido pG48 (Figura 47). La comparación de la secuencia de nucleótidos del clon de *F3'5'H* de genciana (*Gen#48*) (SEQ ID NO:22) contenido en el plásmido pG48 (Figura 47) con el de *F3'5'H* de petunia reveló aproximadamente el 61% de identidad con el clon de *F3'5'H* de petunia *petHf1* (SEQ ID NO:1) y el 64% de identidad con el clon de *F3'5'H* de petunia *petHf2* (SEQ ID NO:3).

65 El vector binario pCGP1498 (*AmCHS 5': gentia F3'5'H: petD8 3'*)

El plásmido pCGP1498 (Figura 48) contiene el clon de ADNc de *F3'5'H* de genciana (*Gen#48*) entre un fragmento del promotor *CHS* de boca de dragón (*AmCHS 5'*) y un fragmento del terminador *PLTP* de petunia (*petD8 3'*) en tándem con el casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario pWTT2132 (Figura 6).

- 5 El clon de ADNc de *F3'5'H* de petunia (*petHf1*) en pCGP725 (descrito en el Ejemplo 4) (Figura 7) se eliminó digiriendo inicialmente con pCGP725 con las endonucleasas de restricción *XbaI* y *BamHI*. Los extremos fueron reparados, el fragmento de ~4,9 kb que contenía el vector con los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* se purificó y ligó con los extremos reparados del fragmento *XhoI/ BamHI* de ~1,7 kb de pG48 (Figura 47) que contenía el clon de ADNc de *F3'5'H* de genciana para producir pCGP1496. La inserción correcta del fragmento de *F3'5'H* de genciana en tándem con los fragmentos *AmCHS 5'* y *petD8 3'* se confirmó mediante el mapeo con endonucleasas de restricción.

15 El casete *AmCHS 5': gentia F3'5'H: petD8 3'* se aisló entonces a partir de pCGP1496 digiriendo inicialmente con la endonucleasa de restricción *NotI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes del plásmido linealizado se repararon y luego el gen quimérico *F3'5'H* se liberó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *EcoRV*. El fragmento purificado de ~3,6 kb se ligó entonces con los extremos *Asp718* reparados del vector binario pWTT2132 (Figura 6). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP1498 (Figura 48).

20 Transformación de clavel y petunia con pCGP1498

El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP1498 (Figura 48) se introdujo en *Dianthus caryophyllus* cultivares Kortina Chanel y Monte Lisa y *Petunia hybrida cv. Skr4 x Sw63* mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

25 El vector binario pBEGHF48 (eCaMV 35S: gentia F3'5'H: nos 3')

El clon de ADNc de *F3'5'H* de genciana se liberó tras la digestión del plásmido pG48 con las endonucleasas de restricción *BamHI* y *XhoI*. El fragmento de ADN de ~1,7 kb resultante se aisló y ligó con pBE2113-GUSs digerido con *BamHI/SalI* (Mitsuhara y col., 1996, arriba) para crear pBEGHF48 (Figura 49).

Transformación de rosa con pBEGHF48

35 El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pBEGHF48 (Figura 49) se introdujo en *Rosa hybrida cv. Lavanda* mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

El vector binario pCGP1982 (CaMV 35S: gentia F3'5'H: ocs 3')

40 El vector binario pCGP1982 (Figura 50) contiene un casete del gen quimérico *CaMV 35S: gentia F3'5'H: ocs 3'* en tándem con el casete del gen marcador de selección *35S 5': SuRB* del vector binario pWTT2132 (Figura 6).

Productos intermedios en la preparación del vector binario pCGP1982

45 El plásmido pG48 (Figura 47) se linealizó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *Asp718*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el clon de ADNc de *F3'5'H* de genciana (*Gen#48*) se liberó tras la digestión con la endonucleasa de restricción *BamHI*. El fragmento de ~1,7 kb se ligó con el fragmento *EcoRI* (extremos reparados)/ *BamHI* de 5,95 kb de pKIWI101 (Janssen y Gardner, 1989, arriba). La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la ampicilina. El plásmido resultante se designó pCGP1981.

50 Un fragmento de ~3,6 kb que contenía el casete del gen quimérico *CaMV 35S: gentia F3'5'H: ocs 3'* se liberó tras la digestión del plásmido pCGP1981 con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *XbaI*. Los extremos de nucleótidos protuberantes se repararon y el fragmento purificado se ligó con los extremos reparados del vector binario digerido por *Asp718*, pWTT2132. La inserción correcta del fragmento se estableció por análisis con endonucleasas de restricción de ADN de plásmido aislado de transformantes resistentes a la tetraciclina. El plásmido resultante se designó pCGP1982 (Figura 50).

Transformación de rosa con pCGP1982

60 El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pCGP1982 (Figura 50) se introdujo en *Rosa hybrida cv. Kardinal* mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

Construcciones de *F3'5'H* de lavanda

65 Aislamiento de un clon de ADNc de *F3'5'H* de pétalos de *Lavandula nil* (lavanda)

Construcción de biblioteca de ADNc de pétalo de lavanda

5 Se compraron de una floristería flores cortadas de una variedad violeta de *Lavandula nil*. Se aisló ARN total de pétalos frescos y pigmentados como se ha descrito anteriormente. Se preparó poli A⁺ ARN usando Oligotex (Takara) según las recomendaciones del fabricante. Se construyó una biblioteca de ADNc de pétalo de lavanda a partir de poli A⁺ ARN usando un kit de síntesis de λZAP-ADNc direccional (Stratagene, EE.UU.) siguiendo los protocolos del fabricante.

10 Selección de una biblioteca de ADNc de lavanda para un clon de ADNc de F3'5'H

La biblioteca de ADNc de pétalo de lavanda se seleccionó con clon de ADNc de F3'5'H de petunia *petHf1* marcado con DIG como se ha descrito previamente (Tanaka et al.1996, arriba). Se identificó un clon de ADNc (LBG) que mostró alta similitud con F3'5'H de petunia *petHf1* y el plásmido se designó pLHF8 (Figura 51). La secuencia de nucleótidos del clon de ADNc de F3'5'H de lavanda (LBG) se designó SEQ ID NO:31.

La comparación de la secuencia de nucleótidos del clon de F3'5'H de lavanda con la de los clones de ADNc de F3'5'H de petunia reveló aproximadamente el 59% de identidad con el clon de F3'5'H de petunia *petHf1* (SEQ ID NO:1) y el 60% de identidad con el clon *petHf2* de petunia (SEQ ID NO:3).

20 El vector binario pBELF8 (eCaMV 35S: lavender F3'5'H: nos 3')

El plásmido de pLHF8 (Figura 51) se digirió con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Xho*I para liberar un fragmento de ADN de ~1,8 kb. El fragmento purificado de ~1,8 kb de pLHF8 se ligó entonces con los extremos digeridos con *Bam*HI-*Sal*I del plásmido pBE2113-GUSs (descrito anteriormente) para crear pBELF8 (Figura 52).

Transformación de rosa con pBELF8

30 El ADN-T contenido en el plásmido del vector binario pBELF8 (Figura 52) se introdujo en *Rosa hybrida* cultivar Lavanda mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

Ejemplo 8

35 Análisis de clavel, petunia y rosa transgénicos

Las plantas transgénicas producidas en los experimentos descritos en el Ejemplo 7 se cultivaron hasta su floración. Las flores se recolectaron y los colores de los pétalos se codificaron usando las cartas de colores de la Real Sociedad Hortícola (RHSCC). Las antocianinas se extrajeron y las antocianidinas se analizaron por análisis espectrofotométrico, CCF y/o HPLC. El ARN total también se aisló de tejido de pétalo de las etapas apropiadas del desarrollo de las flores y se usó análisis de transferencia Northern para detectar transcritos de transgenes F3'5'H. Los resultados de los análisis transgénicos se resumen en las Tablas 11, 12 y 13.

Clavel

45 Los genes F3'5'H descritos en el Ejemplo 7 se evaluaron para su capacidad para conducir a la producción de pigmentos basados en delfinidina en pétalos de clavel. Se usaron dos cultivares de clavel, Kortina Chanel (KC) y Monte Lisa (ML) en los experimentos de transformación. El cultivar de clavel Kortina Chanel produce flores de color rosa que normalmente acumulan antocianinas basadas en cianidina. Por tanto, este cultivar contiene una actividad de F3'H y DFR de clavel que necesitaría una F3'5'H introducida para competir por el sustrato. El cultivar de clavel Monte Lisa produce flores de color rojo ladrillo que normalmente acumulan antocianinas basadas en pelargonidina. Se cree que este cultivar carece de actividad de F3'H completamente funcional y contiene una DFR que es capaz de actuar sobre DHK y por lo tanto una F3'5'H introducida solamente se necesitaría para competir con la DFR endógena por el sustrato.

55 TABLA 11: Resultados de análisis transgénicos de pétalos de claveles transformados con ADN-T que contiene casetes de expresión del gen F3'5'H (*AmCHS* 5': F3'5'H: *petD8* 3')

F3'5'H	pCGP	cv.	nº tg	CCF+	HPLC+	Mayor % de del	% prom de del	Northern+
Salvia#2	2121	KC	22	2/16	3/4	12,5%	7%	nd
		ML	21	17/18	9/9	76%	57%	14/15
Salvia#47	2122	KC	23	6/12	8/8	29%	12%	nd
		ML	25	21/22	17/17	88%	56%	12/14
Sollya	2130	KC	30	22/27	17/17	35%	11%	nd

ES 2 435 737 T3

		ML	23	14/15	14/14	76%	49%	13/14
Campanilla	2135	KC	22	0/16	0/1	nd	nd	nd
		ML	24	19/20	13/13	23%	10%	14/14
Genciana	1498	KC	22	0/14	nd	nd	nd	7/8
		ML	2	2/2	1/1	nd	nd	1/2
BP#18 de pensamiento	1972	KC	26	18/20	12/12	14%	9%	19/19
		ML	21	15/16	8/8	80%	66%	14/16
BP#40 de pensamiento	1973	KC	26	11/15	7/8	18%	8%	13/17
		ML	33	19/22	20/20	72%	52%	12/15
<i>petHf1</i> de petunia	1452	KC	104	41/64	nd	3,5%	1,3%	15/17
		ML	48	39/41	26/26	75%	30%	12/13
<i>petHf2</i> de petunia	1524	ML	27	18/19	17/17	81%	41%	12/14

F3'5'H = secuencia de *F3'5'H* contenida en el ADN-T

pCGP = número de plásmido pCGP del vector binario usado en el experimento de transformación

cv. = cultivar

5 KC = cultivar de clavel Kortina Chanel (línea de cianidina)

ML = cultivar de clavel Monte Lisa (línea de pelargonidina)

nº tg = número total de transgénicos producidos

CCF+ = número de eventos individuales en los que se detectaron moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina en pétalos (como se determina por CCF) con respecto al número total de eventos individuales analizados

10 HPLC+ = número de eventos individuales en los que se detectaron moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina en pétalos (como se determina por HPLC) con respecto al número de eventos individuales analizados

Mayor % de del = mayor % de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina detectadas en los pétalos para la población de eventos transgénicos

% prom = % promedio de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina detectadas en los pétalos para la población de eventos transgénicos

15 Northern = número de eventos individuales en los que se detectaron los transcritos de *F3'5'H* intactos específicos por análisis de transferencia Northern en el ARN total aislado de pétalos con respecto al número total de eventos analizados

nd = no hecho

20 Los resultados sugieren que todas las secuencias de *F3'5'H* evaluadas (*petHf1* de petunia, *petHf2* de petunia, *Sal#2* de salvia, *Sal#47* de salvia, *Sol#5* de Sollya, *BpeaHF2* de campanilla, *BP#18* de pensamiento, *BF#40* de pensamiento y *Gen#48* de genciana) fueron estables en clavel y produjeron la producción de novedosos pigmentos basados en delfinidina en flores de clavel. Los transcritos intactos de cada *F3'5'H* se detectaron por análisis de transferencia Northern en ARN total aislado de pétalos de los claveles transgénicos.

25 Petunia

30 Los genes *F3'5'H* descritos en el Ejemplo 7 se evaluaron para su capacidad para conducir a la producción de pigmentos basados en delfinidina en pétalos de petunia. El híbrido Skr4 x SW63 de *P. hybrida* F1 que es homocigoto recesivo para *Hf1* y *Hf2* se usó en los experimentos de transformación. Aunque Skr4 x SW63 es homocigoto recesivo para *Hf1* y *Hf2*, estas mutaciones no bloquean completamente la producción de *F3'5'H* endógena (véase la patente de EE.UU. nº 5.349.125) y se producen bajos niveles de malvidina para dar al borde del pétalo un color lila pálido. La malvidina es el derivado metilado de las moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina de pigmento 3'5'-hidroxilado (Figuras 1A y 1B). Se usó análisis espectrofotométrico como medida de antocianinas totales que se acumulan en pétalos de las flores de petunia transgénica. El elevado nivel de antocianinas y/o el cambio de color detectado se usaron como guía para la eficacia del gen *F3'5'H* en evaluación.

TABLA 12: Resultados de análisis transgénicos de pétalos de plantas de *P. hybrida* cv. Skr4 x SW63 transformadas con ADN-T que contiene los casetes de expresión del gen *F3'5'H* (*AmCHS* 5': *F3'5'H*: *petD8* 3')

F3'5'H	pCGP	nº tg	CCF+	Col	↑ A/c	Mejor	Prom.	Northern+	Mejor color
control	na	na	na	na	na	144-250		0	75C
#48 de genciana	1498	22	3/5	18/20	nd			6/6	72B/78A
Campanilla	2135	24	18/20	22/24	23/24	4427	2397	nd	74A/78A
Kennedia	2256	24	22/24	22/24	22/24	4212	2592	nd	74A/78A

ES 2 435 737 T3

#2 de salvia	2121	24	21/24	21/24	21/24	2471	1730	nd	78A
#47 de salvia	2122	19	17/19	16/19	16/19	2634	1755	nd	78A/80A
#5 de Sollya	2130	22	14/16	13/16	13/16	3446	1565	nd	78A
BP#18 de pensamiento	1972	22	nd	20/22	nd	nd	nd	9/9	74A/B
BP#40 de pensamiento	1973	19	8/8	18/19	18/20	2583	1556	nd	74/78A
<i>petHf1</i> de petunia	484	16	nd	9/16	8/15	2683	1250	nd	74A/B
<i>petHf2</i> de petunia	1524	20	nd	18/20	8/8	4578	2357	8/8	74A/B

F3'5'H = secuencia de *F3'5'H* contenida en el ADN-T

pCGP = número de plásmido pCGP del vector binario usado en el experimento de transformación

n° tg = número total de transgénicos producidos

5 CCF+ = número de eventos individuales en los que se detectó malvidina en las flores (a un nivel por encima de la referencia de Skr4 x Sw63) (como se determina por CCF) con respecto al número total de eventos individuales analizados

Col = número de eventos individuales que produjeron flores con un color de flor alterado en comparación con el control con respecto al número total examinado

↑ A/c = número de eventos individuales que tuvieron un elevado nivel de antocianinas en pétalos como se mide por análisis espectrofotométrico de extractos crudos con respecto al número de eventos individuales analizados (en μmoles/g)

10 Mejor = mayor cantidad de antocianina como se mide por análisis espectrofotométrico de extractos crudos de una flor de un evento individual (en μmoles/g)

Prom. = la cantidad promedio de antocianina detectada como se mide por análisis espectrofotométrico de extractos crudos de una flor en la población de flores transgénicas analizadas (en μmoles/g)

Northern = número de eventos individuales en los que se detectaron los transcritos de *F3'5'H* intactos específicos por análisis de transferencia

15 Northern en ARN total aislado de pétalos con respecto al número total de eventos analizados

Mejor color = cambio de color más espectacular registrado para la población transgénica

nd = no hecho

na = no aplicable

20 La introducción de los casetes de expresión del gen *F3'5'H* en Skr4 x SW63 condujo a un cambio espectacular del color de la flor de lila pálido a púrpura con un espectacular aumento en la producción de malvidina en los pétalos.

25 El resultado sugiere que todas las secuencias de *F3'5'H* probadas (*petHf1* de petunia, *petHf2* de petunia, *Sal#2* de salvia; *Sal#47* de salvia, *Sol#5* de Sollya, *BpeaHF2* de campanilla, *BP#18* de pensamiento, *BP#40* de pensamiento, *Gen#48* de genciana, *Kenn#31* de Kennedia) fueron estables en pétalos de petunia y produjeron la complementación de la mutación *Hf1* o *Hf2* en la línea de petunia Skr4 x SW63 conduciendo a niveles espectacularmente elevado de acumulación de malvidina con un cambio de color simultáneo.

Rosa

30 Los genes *F3'5'H* descritos en el Ejemplo 7 se evaluaron para su capacidad para conducir a la producción de pigmentos basados en delphinidina en pétalos de rosa. Se usó una selección de tres cultivares de rosa, Kardinal (Kard), Soft Promise (SP) o Lavanda (Lav) en los experimentos de transformación. El cultivar de rosa Kardinal produce flores de color rojo que normalmente acumulan antocianinas basadas en cianidina. Por tanto, este cultivar contiene actividades de F3'H y DFR de rosa que necesitaría la *F3'5'H* introducida para competir por el sustrato.

35 El cultivar de rosa Lavanda produce flores de color rosa claro que normalmente acumulan antocianinas basadas en cianidina. Por tanto, este cultivar contiene actividades de F3'H y DFR de rosa funcionales que necesitaría la *F3'5'H* introducida para competir por el sustrato. El cultivar de rosa Soft Promise produce flores de color albaricoque que normalmente acumulan pelargonidina. Se cree que este cultivar carece de una actividad de F3'H de rosa completamente funcional y contiene una DFR que es capaz de actuar sobre DHK y así la *F3'5'H* introducida

40 solamente se requeriría para competir con la DFR endógena de rosa por el sustrato.

TABLA 13: Resultados de análisis transgénicos de pétalos de rosas transformadas con ADN-T que contienen casetes de expresión del gen *F3'5'H* (*CaMV 35S: F3'5'H: ocs 3*)

<i>F3'5'H</i>	plásmido	Cult	n° tg	CCF +	HPLC+	Mayor % de del	% prom de del	Northern+
2 de salvia	pCGP2120	Kard	30	18/20	21/21	12%	5%	18/18
47 de salvia	pCGP2119	Kard	22	11/16	9/9	7,1%	2%	12/15
Sollya	pCGP2131	Kard	27	0/23	2/2	1%	0,5%	6/6
Campanilla	pCGP2134	Kard	29	0/15	nd	na	na	0/9
	pBEBF5	Lav	25	nd	0/25	0%	0%	nd

Genciana	pCGP1482	Kard	27	0/23	nd	na	na	0/23
	pBEGHF48	Lav	23	nd	0/23	0%	0%	0/23
BP18 de pensamiento	pCGP1967	Kard	56	30/33	33/34	58%	12%	21/21
		SP	36	21/24	18/18	65%	35%	16/21
BP40 de pensamiento	pCGP1969	Kard	22	15/15	15/15	24%	9%	16/16
		SP	37	17/17	16/17	80%	54%	11/13
<i>petHf1</i> de petunia	pCGP1638	Kard	22	0/21	nd	na	na	0/16
	pCGP1392	Lav	34	nd	0/34	0%	0%	nd
<i>petHf2</i> de petunia	pCGP2123	Kard	41	0/26	nd	na	na	0/10
Lavender	pBELF8	Lav	28	nd	4/28	4%	3,5%	nd

F3'5'H = secuencia de F3'5'H contenida en el ADN-T

plásmido = el número de plásmido del vector binario usado en el experimento de transformación

Cult = cultivar de *Rosa hybrida*

Kard = Kardinal

5 SP = Soft Promise

Lav = Lavanda

n° tg = n° de eventos transgénicos independientes producido

CCF+ = número de eventos individuales que acumularon moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina detectables (como se determina por CCF) en los pétalos con respecto al número total de eventos individuales analizados

10 HPLC+ = número de eventos individuales que acumularon moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina detectables (como se determina por HPLC) en los pétalos con respecto al número de eventos individuales analizados

Northern = número de eventos individuales en los que se detectaron los transcritos de F3'5'H intactos específicos por análisis de transferencia Northern en el ARN total aislado de pétalos con respecto al número total de eventos analizados

nd = no hecho

15 Los resultados sugieren sorprendentemente que no todas las secuencias de F3'5'H evaluadas (*petHf1* de petunia, *petHf2* de petunia, *Sal#2* de salvia, *Sal#47* de salvia, *Sol#5* de Sollya, *BpeaHF2* de campanilla, *BP#18* de pensamiento, *BP#40* de pensamiento, *Gen#48* de genciana, *Kenn#31* de Kennedia y Lavender LBG) fueron funcionales en la rosa. En efecto, los transcritos de las secuencias de F3'5'H introducidas aisladas de *Clitoria ternatea* (campanilla), *Gentiana triflora* (genciana) y *Petunia hybrida* (petunia) fracasaron en acumularse en pétalos de rosa. Solamente los transcritos de F3'5'H de longitud completa de pensamiento, salvia, Kennedia, Sollya y lavanda se acumularon en pétalos de rosa. Sin embargo, aunque los transcritos de F3'5'H de Kennedia se acumularon en pétalos de rosa, no hubo ni acumulación de la enzima ni la enzima producida fue tanto no funcional como fue incapaz de competir con las enzimas F3'H y DFR de rosa endógenas para permitir la producción de pigmentos de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina. De las secuencias de F3'5'H evaluadas, solamente las secuencias de F3'5'H derivadas de clones de ADNc de *Salvia spp.* (*Sal#2* y *Sal#47*), *Viola spp.* (*BP#18* y *BP#40*), *Sollya spp.* (*Soll#5*) y *Lavandula nil* (LBG) produjeron la producción de pigmentos basados en moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina en pétalos de rosa. Basándose en los porcentajes relativos de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina producidas en pétalos de rosa, las secuencias de F3'5'H de pensamiento (*BP#18* y *BP#40*) se revelaron como las más eficaces de aquellas evaluadas en la producción de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina en pétalos de rosa.

Introducción de la secuencia de F3'5'H de *Viola spp.* en *Rosa hybrida cv. Medeo y Pamela*

35 Como se ha descrito en la introducción, la copigmentación con otros flavonoides, posterior modificación de la molécula de antocianidina y el pH de la vacuola, impactan sobre el color producido por las antocianinas. Por tanto, la selección de los cultivares de rosa con niveles relativamente altos de flavonoles y pH vacuolar relativamente alto produciría colores de flor más azules tras la producción de pigmentos de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina.

40 El cultivar de rosa Medeo generalmente produce flores de color crema a albaricoque pálido (RHSCC 158C a 159A). El análisis por HPLC de las antocianidinas y los flavonoles que se acumulan en los pétalos de la rosa Medeo reveló que los pétalos acumulan altos niveles de flavonoles (2,32 mg/g de canferol, 0,03 mg/g de quercetina) y niveles muy bajos de antocianinas (0,004 mg/g de cianidina, 0,004 mg/g pelargonidina). El pH vacuolar estimado de pétalos de Medeo es aproximadamente 4,6.

El cultivar de rosa Pamela produce flores de color blanco a rosa muy pálido. Acumula similarmente bajos niveles de antocianina y niveles relativamente altos de flavonoles.

50 El ADN-T contenido en la construcción pCGP1969 (Figura 30) que incorpora el clon de F3'5'H de pensamiento,

BP#40, también se introdujo en los cultivares de rosa Medeo y Pamela produciendo la producción de más del 90% de moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina en estas rosas y conduciendo a un cambio espectacular del color y a flores de colores novedosos. El cambio de color más espectacular en las flores transgénicas de Medeo fue a un color púrpura/violeta de RHSCC 70b, 70c, 80c, 186b. El cambio de color más espectacular en las flores transgénicas de Pamela fue a un color púrpura/violeta de RHSCC 71c, 60c, 71a, 80b.

En conclusión, se revelaron dos hallazgos inesperados cuando las secuencias de genes que habían demostrado conducir a funcionalidad en petunia y clavel se introdujeron en rosas.

Primero, las secuencias de *F3'5'H* de petunia *petHf1* (y *petHf2*) que habían producido la producción de colores novedosos en clavel y que también habían demostrado que conducían a la síntesis de una enzima funcional en petunia no condujeron a la acumulación de transcrito de longitud completa (o intacto) (como es detectable por análisis de transferencia Northern) en pétalos de rosa. En efecto, no hubo ni acumulación de transcrito de longitud completa o intacto ni los transcritos que se detectaron se degradaron y se vieron como manchas de bajo MW (o de migración rápida) en transferencias de ARN indicando la presencia de ARN de hibridación heterólogo de bajo MW. Por tanto, con el fin de encontrar una secuencia de *F3'5'H* que se acumulara en rosa y condujera a una enzima funcional, se aislaron varias secuencias de *F3'5'H*. De nuevo no fue obvio qué secuencia conduciría a una enzima activa en pétalos de rosa. Todas las secuencias de *F3'5'H* aisladas se probaron para funcionalidad en clavel y/o petunia y todas condujeron a la acumulación de transcritos intactos y a la producción de una actividad de *F3'5'H* funcional. Sin embargo, solamente las secuencias de *F3'5'H* de pensamiento (*BP#18* y *BP#40*), salvia (*Sal#2* y *Sal#47*), Sollya (*Soll#5*), Kennedia (*Kenn#31*) y lavanda (*LBG*) produjeron la acumulación de transcritos de longitud completa intactos y solamente las de pensamiento (*BP#18* y *BP#40*), salvia (*Sal#2* y *Sal#47*), Sollya (*Soll#5*) y lavanda (*LBG*) produjeron la producción de una enzima funcional en rosa como se mide por la síntesis de moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina.

En segundo lugar, no fue obvio qué promotores serían eficaces en rosa. Los casetes de promotor que se habían probado y habían demostrado que eran funcionales en flores de clavel y petunia no condujeron a la acumulación de transcritos detectables en pétalos de rosa. De los promotores probados en rosa, solamente los promotores *CaMV 35S*, *RoseCHS 5'*, *ChrysCHS 5'*, *mas 5'* y *nos 5'* condujeron a una acumulación de transcritos *GUS* o *nptII* o *SuRB* intactos y detectables en pétalos de rosa.

La Tabla 14 muestra un resumen de los resultados obtenidos cuando se evalúan secuencias de *F3'5'H* de diversas especies en petunia, clavel y rosa.

35 TABLA 14: Resumen de la eficacia de las secuencias de *F3'5'H* en petunia, clavel y rosa

<i>F3'5'H</i>	Petunia		Clave		Rosa	
	Mal	ARN	Del	ARN	Del	ARN
Kennedia (<i>Kenn#31</i>)	+	nd	nd	nd	-	+
Genciana (<i>Gen#48</i>)	+	+	+	+	-	-
Salvia (<i>Sal#2</i>)	+	nd	+	+	+	+
Salvia (<i>Sal#47</i>)	+	nd	+	+	+	+
Sollya (<i>Soll#5</i>)	+	nd	+	+	+	+
Campanilla (<i>BpeaHF2</i>)	+	nd	+	+	-	-
Pensamiento (<i>BP#18</i>)	+	+	+	+	+	+
Pensamiento (<i>BP#40</i>)	+	nd	+	+	+	+
Petunia (<i>petHf1</i>)	+	+	+	+	-	-
Petunia (<i>petHf2</i>)	+	+	+	+	-	-
Lavanda (<i>LBG</i>)	nd	nd	nd	nd	nd	+

nd = no hecho

Mal = malvidina detectada en pétalos como se analiza por CCF

Del = moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina detectadas en pétalos como se analiza por CCF o HPLC

+ = sí

40 - = no

Ejemplo 9

45 Uso de secuencias de *F3'5'H* de pensamiento en especies diferentes de rosa

Gerbera

De los ejemplos anteriores fue evidente que las secuencias de *F3'5'H* de pensamiento, *BP#18* y *BP#40*, produjeron la actividad de *F3'5'H* funcional y condujeron a la producción de altos niveles de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina en rosas y claveles.

El ADN-T de la construcción binaria pCGP1969 (descrita en el Ejemplo 8) (Figura 30) que contenía el casete de expresión del gen quimérico *CaMV 35S: pansy BP#40 F3'5'H: ocs 3'* se introdujo en el cultivar de gerbera Boogie mediante transformación mediada por *Agrobacterium*, para probar la funcionalidad de la secuencia de *F3'5'H* de pensamiento en gerbera.

De los seis eventos producidos hasta la fecha, uno (#23407) ha producido flores con un cambio espectacular de color (RHSCC 70c) en comparación con el color de la flor de control (RHSCC 38a, 38c).

El cambio de color de los pétalos de la gerbera transgénica se ha correlacionado con la presencia de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina como se detecta por CCF.

Otras especies

Con el fin de producir pigmentos de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina en plantas que normalmente no producen pigmentos basados en delfinidina y no contienen flavonoide 3',5'-hidroxilasa, construcciones que contienen un gen *F3'5'H* (tales como, pero no se limitan a un gen quimérico *F3'5'H* de *Viola spp.* y/o *Salvia spp.* y/o *Sollya spp.* y/o *Lavandula spp.* y/o *Kennedia spp.*) se introducen en una especie que normalmente no produce pigmentos basados en delfinidina. Tales plantas pueden incluir, pero no se limitan a clavel, crisantemo, gerbera, orquídeas, *Euphorbia*, *Begonia* y manzana.

Ejemplo 10Características de las secuencias de *F3'5'H* evaluadas en petunia, clavel y rosa

La regulación génica en los eucariotas se facilita, en términos simples, por varios factores que interaccionan con una gama de secuencias proximales y distales a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido dado. Los casetes de expresión manipulados para la introducción en plantas para la generación de uno o más rasgos se basan en el entendimiento de la regulación génica en eucariotas en general y, en casos seleccionados, en plantas en particular. Los elementos esenciales incluyen una serie de secuencias de regulación de la transcripción normalmente, pero no exclusivamente, localizadas aguas arriba o en 5' con respecto al punto de iniciación de la transcripción. Tales elementos se describen normalmente como potenciadores y promotores, siendo estos últimos proximales al punto de la iniciación de la transcripción. Inmediatamente aguas abajo de o en 3' con respecto a la iniciación del punto de transcripción está una región variable de ADN transcrito que indica la región no traducida 5' (5'utr) que desempeña una función en la estabilidad del transcrito y la eficiencia de traducción. Tales secuencias, cuando se manipulan en casetes de expresión, son frecuentemente quiméricas y pueden derivarse de secuencias que se producen naturalmente adyacentes a la secuencia codificante y/o adyacentes a una secuencia de promotor dada. La secuencia codificante (algunas veces alterada por intrones) se encuentra en 3' con respecto a la 5'utr seguida por una 3'utr importante para la estabilidad del transcrito (ARNm) y la eficiencia de traducción. Las secuencias 3' con respecto al extremo de la región codificante y 3' con respecto a la misma 3'utr indican secuencias de terminador. Todos estos elementos constituyen un casete de expresión. Al hacer comparaciones directas entre los promotores u otros elementos es importante mantener la uniformidad en los elementos restantes de un casete de expresión. De ahí que cuando se comparó la eficacia de diversas secuencias de *F3'5'H* fuera posible confinar las secuencias que conducen a inestabilidad y posterior autodegradación de ARNm manipulado y la ausencia resultante de productos tri-hidroxilados (derivados de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina) con respecto a la región que codifica *F3'5'H* y no otros elementos en el casete de expresión tales como, por ejemplo, las secuencias 5'utr y/o 3'utr.

En un intento por identificar motivos o similitudes entre las secuencias de *F3'5'H* que produjeron transcritos de longitud completa que se detectan en ARN total aislado de flores de rosa, y finalmente la producción de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina, se realizaron comparaciones a través de una gama de parámetros. Éstos incluyeron identidades de secuencias a niveles de ácido nucleico y aminoácidos, alineamientos de secuencia, clasificaciones taxonómicas, % de nucleótidos A o T presentes en la secuencia, % de codones con una A o una T en la tercera position, etc.

Clasificación taxonómica

Se examinó la taxonomía de cada especie de las que se aislaron las secuencias de *F3'5'H* (Tabla 15). Parece que no hubo una relación obvia entre la clasificación de subclases y si las secuencias de *F3'5'H* produjeron o no un transcrito intacto y la posterior producción de moléculas de delfinidina o basadas en delfinidina en rosas.

Tabla 15: Clasificaciones taxonómicas de las especies de las que se aislaron las secuencias de *F3'5'H* y si el uso de las secuencias produjo o no un transcrito intacto en pétalos de rosa que fuera detectable por análisis de transferencia de ARN

Flor	Especie	Familia	Orden	Subclase	Transcrito intacto	Delfinidina en pétalos de rosa
genciana	<i>Gentiana triflora</i>	Gentianaceae	Gentianales	Asteridae	NO	NO
lavanda	<i>Lavandula nil</i>	Lamiaceae	Lamiales	Asteridae	SÍ	SÍ
salvia	<i>Salvia spp.</i>	Lamiaceae	Lamiales	Asteridae	SÍ	SÍ
Sollya	<i>Sollya spp.</i>	Pittosporaceae	Apiales	Asteridae	SÍ	SÍ
petunia	<i>Petunia hybrida</i>	Solanaceae	Solanales	Asteridae	NO	NO
Kennedia	<i>Kennedia spp.</i>	Fabaceae	Fabales	Rosidae	SÍ	NO
campanilla	<i>Clitoria ternatea</i>	Fabaceae	Fabales	Rosidae	NO	NO
pensamiento	<i>Viola spp.</i>	Violaceae	Malpighiales	Rosidae	SÍ	SÍ
rosa	<i>Rosa hybrida</i>	Rosaceae	Rosales	Rosidae	na	na

Transcrito intacto = ARNm de *F3'5'H* de longitud completa detectado por análisis de transferencia Northern en ARN total aislado de pétalos de rosas transgénicas

5

Comparación de secuencias de nucleótidos de *F3'5'H*

Las identidades de secuencias de nucleótidos entre cada una de las secuencias de *F3'5'H* evaluadas se determinaron usando el programa ClustalW (Thompson y col., 1994, arriba) dentro del programa de aplicación MacVector™ versión 6.5.3 (Oxford Molecular Ltd., Inglaterra) (Tabla 16). No hubo diferencias obvias entre las secuencias de *F3'5'H* que produjeron la detección de transcritos de longitud completa intactos de ARN aislado de pétalos de rosa y aquellos que no la produjeron.

10

Tabla 16: Porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos entre las secuencias de nucleótidos de *F3'5'H* aisladas de diversas especies. Las secuencias de *F3'5'H* que produjeron transcritos intactos que se detectaron en ARN aislado de pétalos de rosa están subrayadas y en cursiva

	<i>BP18</i>	<i>BP40</i>	<i>Lav</i>	<i>Sal147</i>	<i>Sal2</i>	<i>soll</i>	<i>Kenn</i>	<i>Bpea</i>	<i>Gent</i>	<i>PetHf1</i>	<i>PetHf2</i>
<i>BP18</i>	100	82	60	61	62	51	60	62	62	59	62
<i>BP40</i>		100	60	57	58	50	59	62	58	60	62
<i>Lav</i>			100	68	68	48	57	57	58	59	60
<i>Sa147</i>				100	95	48	56	57	59	57	58
<i>Sal2</i>					100	49	57	58	60	57	59
<i>Soll</i>						100	48	50	50	48	51
<i>Kenn</i>							100	70	56	64	60
<i>Bpea</i>								100	59	59	62
<i>Gent</i>									100	61	64
<i>PetHf1</i>										100	84
<i>PetHf2</i>											100

Comparación de secuencias de nucleótidos traducidas de *F3'5'H*

También se determinaron las identidades y similitudes de secuencias de nucleótidos traducidas entre cada una de las secuencias de *F3'5'H* evaluadas usando el programa ClustalW (Thompson y col., 1994, arriba) dentro del programa de aplicación MacVector™ versión 6.5.3 (Oxford Molecular Ltd., Inglaterra) (Tabla 17). No hubo diferencias obvias entre las secuencias de *F3'5'H* que produjeron la detección de transcritos de longitud completa intactos en ARN aislado de pétalos de rosa y aquellos que no la produjeron.

20

25

Tabla 17: Porcentaje de identidad y similitud de secuencias de aminoácidos (entre paréntesis) entre secuencias de F3'5'H aisladas de diversas especies. Las secuencias de F3'5'H que produjeron transcritos intactos que se detectaron en ARN aislado de pétalos de rosa están subrayadas y en cursiva.

	<i>BP18</i>	<i>BP40</i>	<i>Lav</i>	<i>Sal47</i>	<i>Sal2</i>	<i>Soll</i>	<i>Kenn</i>	<i>Bpea</i>	<i>Gent</i>	<i>PetHf1</i>	<i>PetHf2</i>
<i>BP18</i>	100	91 (94)	65 (77)	65 (76)	65 (76)	44 (63)	69 (83)	64 (75)	69 (80)	74 (85)	74 (85)
<i>BP40</i>		100	67 (89)	66 (77)	66 (77)	46 (64)	69 (82)	64 (75)	68 (79)	74 (85)	75 (86)
<i>Lav</i>			100	75 (86)	75 (86)	45 (63)	63 (79)	59 (74)	66 (80)	68 (82)	69 (83)
<i>Sal47</i>				100	98	45 (65)	64 (78)	60 (72)	64 (76)	68 (79)	69 (81)
<i>Sal2</i>					100	45 (65)	64 (78)	60 (72)	63 (75)	68 (79)	69 (81)
<i>Soll</i>						100	46 (66)	41 (61)	44 (62)	46 (67)	46 (66)
<i>Kenn</i>							100	72 (80)	65 (75)	71 (83)	72 (83)
<i>Bpea</i>								100	69 (81)	65 (75)	65 (74)
<i>Gent</i>									100	73 (82)	73 (82)
<i>PetHf1</i>										100	93 (95)
<i>PetHf2</i>											100

5

Porcentaje de nucleótidos A o T en las secuencias de ADN de F3'5'H.

Hay algunas pruebas que sugieren que la selección de los codones influye en la tasa de traducción y degradación de ARNm. Ciertos codones se usan menos frecuentemente que otros y esto puede estar relacionado con la abundancia de ARNt isoaceptor. Los ARN de transferencia correspondientes a codones raros son menos abundantes en *E. coli* y levadura que los ARNt correspondientes a codones preferidos (van Hoof y Green, *Plant Molecular Biology*, 35: 383-387, 1997). Ejemplos de uso alterado de codones y de producción de un gen más "similar a plantas" son el gen de la toxina *B.t.* bacteriana (revisado en Diehn y col., *Genet Engin*, 18: 83-99, 1996) y el gen *gfp* de medusa (Haseloff y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 94: 2122-2127, 1997). Sin embargo, como se comenta en van Hoff y Green, (1997) (arriba), el efecto de eliminar los codones raros en los genes *B.t.* aumentó el contenido de GC, eliminando así secuencias ricas en AU que pueden ser responsables del reconocimiento inapropiado de intrones y sitios de poliadenilación, además de eliminar determinantes de la inestabilidad. La alteración del uso de codones en el gen *gfp* de medusa también produjo la eliminación de un intrón críptico (Haseloff y col., 1996, arriba). Los estudios que examinan el efecto del uso de codones y los elementos de inestabilidad generalmente se han limitado a diferencias entre los genes aislados de especies en diferentes reinos, es decir, bacteriano frente a levadura frente a animal frente a vegetal. Dentro del reino vegetal se han observado diferencias entre las dicotiledóneas y las monocotiledóneas. Estudios sobre plantas transgénicas han sugerido que los fragmentos de promotor usados para conducir la expresión génica en plantas dicotiledóneas no son tan eficaces cuando se usan en plantas monocotiledóneas (véase Galun y Breiman, *Transgenic Plants*, Imperial College Press, Londres, Inglaterra, 1997). Las diferencias en la metilación y en la expresión final de un transgén de *DFR* en *Petunia hybrida* (dicotiledónea) se detectaron cuando un ADNc de *DFR* de maíz (monocotiledónea) se comparó con un ADNc de *DFR* de gerbera (dicotiledónea) (Elomaa y col., *Molecular and General Genetics*, 248: 649-656, 1995). La conclusión fue que el ADNc de *DFR* de gerbera tenía un mayor contenido de AT (menor contenido de GC) y era más "compatible" con la organización genómica de la petunia evitando que fuese reconocido como un gen exógeno y por tanto silenciado por metilación (la rosa junto con el clavel y la petunia son dicotiledóneas y los genes *F3'5'H* probados se aislaron todos de plantas dicotiledóneas). Estos puntos sirven para ilustrar que los mecanismos de degradación y estabilidad no son entendidos en detalle y que aparecen diferencias entre plantas y otros reinos y dentro del reino vegetal.

Se examinó el contenido de A y T en los ADNc de *F3'5'H* evaluados junto con los de los genes de la ruta de los flavonoides (*F3'H*, *DFR*, *CHS*, *FLS*) que se habían aislado de rosa (Tabla 18). También se examinó la tercera posición de cada codón (dentro del marco de lectura abierto) y se calculó el porcentaje de codones con una A o una T en la tercera posición (Tabla 18).

Tabla 18: Resumen de la cantidad en porcentaje de los dinucleótidos A o T en las secuencias de *F3'5'H* aisladas y si la *F3'5'H* produjo o no transcritos de longitud completa que se detectaron en pétalos de rosa por análisis de transferencia Northern

SEQ de F3'5'H	% de AT	% de A o T en 3ª	ARN	Delfinidina
<i>BP#18</i> de <i>Viola</i>	50	40	SÍ	SÍ
<i>BP#40</i> de <i>Viola</i>	51	35	SÍ	SÍ

#2 de salvia	48	33	SÍ	SÍ
#47 de salvia	48	34	SÍ	SÍ
#5 de Sollya	54	54	SÍ	SÍ
LBG de lavanda	50	37	SÍ*	SÍ
#31 de Kennedia	54	47	SÍ	NO
<i>petHf1</i> de petunia	61	66	NO	NO
<i>petHf2</i> de petunia	59	65	NO	NO
#48 de genciana	57	57	NO	NO
#HF2 de campanilla	57	53	NO	NO
<i>F3'H</i> de rosa	47	34	**	na
<i>CHS</i> de rosa	52	42	**	na
<i>DFR</i> de rosa	53	46	**	na
<i>FLS</i> de rosa	56	43	**	na

% de AT = % de nucleótidos que son A o T en la secuencia de ácidos nucleicos

% de A o T en 3ª = porcentaje de codones que tienen una A o una T en la tercera posición

ARN = si un transcrito de ARNm de longitud completa se detectó o no por análisis de transferencia Northern en ARN total aislado de pétalos de rosa

5 Del = si las moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina se detectaron o no por CCF o HPLC en pétalos de rosa

SÍ* = aunque no se realizó el análisis de transferencia Northern de las rosas transgénicas transformadas con los casetes de expresión de *F3'5'H* de lavanda, puede suponerse que el transcrito de longitud completa se produce ya que se detectaron moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina en los pétalos de rosa.

F3'H de rosa (descrito en la solicitud de patente interna nº PCT/AU97/00124)

10 *DFR* de rosa (Tanaka y col., 1995, arriba)

FLS de rosa (número de acceso de GenBank AB038247)

CHS de rosa (número de acceso de GenBank AB038246)

15 El contenido de AT de las cuatro secuencias de rosa (arriba) que codifican enzimas de la ruta de los flavonoides tuvo un contenido de AT de entre el 47 y el 56%. En general, el contenido de AT de las secuencias de *F3'5'H* que produjeron transcritos intactos en pétalos de rosa estuvo entre el 48 y el 54%. Sin embargo, las secuencias de *F3'5'H* que no produjeron transcritos intactos que se acumulaban en pétalos de rosa tuvieron generalmente un mayor contenido de AT de entre el 57 y el 6%. De ahí que el contenido de AT de los genes *F3'5'H* introducidos en rosa pueda ser un factor en si un transcrito intacto se acumula o no en pétalos de rosa y así conduce a la producción de *F3'5'H* y moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina.

25 La base de nucleótido en la tercera posición de cada codón de las cuatro secuencias de rosa que codifican enzimas de la ruta de los flavonoides fue generalmente una A o una T en del 34 al 46% de los codones. En general, las secuencias de *F3'5'H* que produjeron transcritos intactos en pétalos de rosa contuvieron una A o una T en la tercera posición de cada codón en del 33 al 54% de los codones. Sin embargo, las secuencias de *F3'5'H* que no produjeron transcritos intactos que se acumularan en pétalos de rosa generalmente contuvieron una A o una T en la tercera posición de cada codón en del 53 al 66% de los codones. Así, el porcentaje de codones con una A o una T en la tercera posición de los genes *F3'5'H* introducidos en la rosa puede ser también un factor en si un transcrito intacto se acumula o no en pétalos de rosa y así conduce a la producción de *F3'5'H* y moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina.

35 Puede ser que alterando el contenido global de los nucleótidos A y/o T en cualquier secuencia de ADN de *F3'5'H* que no produzca transcrito intacto en rosa tal como, pero no limita a, *petHf1* de *Petunia hybrida*, *petHf2* de *Petunia hybrida*, *BpeaHF2* de *Clitoria ternatea* (campanilla) o *Gen#48* de *Gentiana triflora* (genciana), hasta un nivel más consistente con el encontrado en genes de rosa, transcritos intactos se acumulen y produzcan la traducción eficaz de transcritos de *F3'5'H* y así la acumulación de moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina en pétalos de rosa. Una manera de alterar el contenido de AT de la secuencia de ADN sin alterar la secuencia de aminoácidos es elegir como diana la generación de la tercera posición de cada codón.

40 Aquellos expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible a

variaciones y modificaciones distintas de aquellas específicamente descritas. Debe entenderse que la invención incluye todas aquellas variaciones y modificaciones que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones.

Bibliografía

- 5 A look beyond transcription, ASPP, USA, Bailey-Serres and Gallie, eds, 1998
- Altschul y col., J. Mol. Biol. 215(3): 403-410, 1990.
- 10 Altschul y col., Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402. 1997.
- Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.
- Aviv y Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408, 1972.
- 15 Bevan, Nucleic Acids Res 12: 8711-8721, 1984.
- Bonner y Laskey, Eur. J. Biochem. 46: 83, 1974.
- 20 Bodeau, Molecular and genetic regulation of Bronze-2 and other maize anthocyanin genes. Disertación, Universidad de Stanford, EE.UU., 1994
- Brendel y col., en A look beyond transcription, ASPP, USA, Bailey-Serres and Gallie, eds, 1998.
- 25 Brouillard y Dangles, en: The Flavonoids - Advances in Research since 1986. Harborne, J.B. (ed), Chapman and Hall, Londres, RU, 1-22, 1993.
- Brugliera y col., Plant J. 5: 81-92, 1994.
- 30 Brugliera, Characterization of floral specific genes isolated from Petunia hybrida. RMIT, Australia. Tesis doctoral, 1994.
- Bullock y col., Biotechniques 5: 376, 1987.
- 35 Comai y col., Plant Mol. Biol. 15: 373-381, 1990.
- Depicker y col., J Mol. and Appl. Genetics 1: 561-573, 1982.
- Diehn y col., Genet Engin, 18: 83-99, 1996
- 40 Elomaa y col., Molecular and General Genetics, 248: 649-656, 1995
- Franck y col., Cell 21: 285-294, 1980.
- 45 Galun y Breiman, Transgenic Plants, Imperial College Press, Londres, Inglaterra, 1997
- Guilley y col., Cell 30: 763-773. 1982.
- Hanahan, J. Mol. Biol. 166: 557, 1983.
- 50 Harpster y col., MGG 212: 182-190, 1988.
- Haseloff y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 94: 2122-2127, 1997
- 55 Holton y Cornish, Plant Cell 7: 1071-1083, 1995.
- Holton y Graham, Nuc. Acids Res. 19: 1156, 1990.
- Holton y col., Nature 366: 276-279, 1993a.
- 60 Holton y col., Plant J. 4: 1003-1010, 1993b
- Holton, Isolation and characterization of petal specific genes from Petunia hybrida. Tesis doctoral, Universidad de Melbourne, Australia, 1992
- 65 Huang y Miller, Adv. Appl. Math. 12: 373-381, 1991.

- Inoue y col., *Gene* 96: 23-28, 1990.
- 5 Janssen y Gardner, *Plant Molecular Biology*, 14: 61-72, 1989
- Jefferson, y col., *EMBO J.* 6: 3901-3907, 1987.
- Johnson y col., In *A look beyond transcription*, ASPP, USA, Bailey-Serres and Gallie, eds, 1998.
- 10 Karn y col., *Gene* 32: 217-224, 1984.
- Lazo y col. *Bio/Technology* 9: 963-967, 1991.
- 15 Lee y col., *EMBO J.* 7: 1241-1248, 1988.
- Lu y col., *Bio/Technology* 9: 864-868, 1991.
- Marchant y col., *Molecular Breeding* 4: 187-194, 1998.
- 20 Marmur y Doty, *J. Mol. Biol.* 5: 109, 1962.
- McBride y Summerfelt, *Plant Molecular Biology* 14: 269-276, 1990.
- Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149, 1964.
- 25 Mitsuhashi y col., *Plant Cell Physiol.* 37: 49-59, 1996.
- Mol y col., *Trends Plant Sci.* 3: 212-217, 1998.
- 30 Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(8): 2444-2448, 1988.
- Plant Molecular Biology Labfax*, Croy (ed), Bios scientific Publishers, Oxford, RU, 1993.
- 35 *Plant Molecular Biology Manual* (2ª edición), Gelvin and Schilperoot (eds), Kluwer Academic Publisher, Los Países Bajos, 1994.
- Robinson y Firoozabady, *Scientia Horticulturae* 55: 83-99, 1993.
- Rout y col., *Scientia Horticulturae* 81: 201-238, 1999.
- 40 Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU., 1989.
- 45 Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001
- Seitz y Hinderer, *Anthocyanins*. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Constabel, F. and Vasil, I.K. (eds.), Academic Press, New York, EE.UU., 5: 49-76, 1988.
- 50 Short y col., *Nucl. Acids Res.* 16: 7583-7600, 1988.
- Sommer y Saedler, *Mol Gen. Gent.*, 202: 429-434, 1986.
- 55 Strack y Wray, In: *The Flavonoids - Advances in Research since 1986*. Harborne, J.B. (ed), Chapman and Hall, Londres, RU, 1-22, 1993.
- Tanaka y col., *Plant Cell Physiol.* 36: 1023-1031, 1995.
- Tanaka y col., *Plant Cell Physiol.* 37: 711-716, 1996.
- 60 Thompson y col., *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680, 1994.
- Turpen y Griffith, *BioTechniques* 4: 11-15, 1986.
- 65 van Hoof y Green, *Plant Molecular Biology*, 35: 383-387, 1997

Winkel-Shirley, Plant Physiol. 126: 485-493, 2001a.

Winkel-Shirley, Plant Physiol. 127: 1399-1404, 2001b.

5 Yonekura-Sakakibara y col., Plant Cell Physiol. 41: 495-502, 2000.

Listado de secuencias

<110> International Flower Developments Pty. Ltd.

10 <120> Secuencias genéticas de flavonoide 3',5'-hidroxilasa y usos de las mismas

<130> 42.20.86861/01

<150> AU 2002951088

<151> 30-08-2002

<150> AU 2002952835

15 <151> 16-09-2002

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1812

20 <212> ADN

<213> petunia

<400> 1

ctttctacta gctacttcgt tatatatatg taaaattgtg actttgaaa tcatttaa	60
tatcataagg ttcattttat cttgatcaaa atatttactt cggccatata cgttttcctt	120
tagtcatgat gctacttact gagcttggtg cagcaacttc aatctttcta atagcacaca	180
taatcatttc aactcttatt tcaaaaacta ccggccgga tctaccgccg gggccaagag	240
ggtggccggt gatcggagca cttccacttt taggagccat gccacatggt tccttagcta	300
aaatggcaaa aaaatatgga gcaatcatgt atctcaaagt tggaacatgt ggcattggcag	360
ttgcttctac ccctgatgct gctaaagcat tcttgaaaac acttgatata aacttctcca	420
atcgtccacc taatgcaggt gccactcact tagcttataa tgctcaagac atggtttttg	480
cacattatgg accacgatgg aagttgctaa ggaaattaag caacttgcatt atgctagggg	540
gaaaagcctt agagaattgg gcaaatgttc gtgccaatga gctagggcac atgctaaaat	600
caatgtccga tatgagtcga gagggccaga gggttgtggt ggcggagatg ttgacatttg	660

ES 2 435 737 T3

ccatggccaa tatgatcgga caagtgatgc taagcaaaag agtatttgta gataaagggtg 720
 ttgaggtaaa tgaatttaag gacatgggtg tagagttaat gacaatagca gggatatttca 780
 acattgggtga ttttattcct tgtttagctt ggatggattt acaagggata gaaaaacgaa 840
 tgaaacgttt acataagaag tttgatgctt tattgacaaa gatgtttgat gaacacaaaag 900
 caactaccta tgaacgtaag gggaaaccag attttcttga tgttgttatg gaaaatgggg 960
 acaattctga aggagaaaga ctcaagtaca ccaacatcaa agcacttttg ctgaatttgt 1020
 tcacagctgg tacggacact tcttctagtg caatagaatg ggcacttgca gaaatgatga 1080
 agaaccctgc cattttgaaa aaagcacaag cagaaatgga tcaagtcatg ggaagaaata 1140
 ggcgtttact cgaatccgat atcccaaadc tcccttacct ccgagcaatt tgcaaagaaa 1200
 catttcgaaa acacccttct acaccattaa atcttcttag gatctcgaac gaaccatgca 1260
 tagtcgatgg ttattacata ccaaaaaaca ctaggcttag tgtaacata tgggcaattg 1320
 gaagagatcc ccaagtttgg gaaaatccac tagagtttaa tcccgaaga ttcttgagtg 1380
 gaagaaactc caagattgat cctcgaggga acgattttga attgatacca tttggtgctg 1440
 gacgaagaat ttgtgcagga acaagaatgg gaattgtaat ggtggaatat atattaggaa 1500
 ctttggttca ttcatttgat tggaaattac caagtgaagt tattgagttg aatatggaag 1560
 aagcttttgg cttagctttg cagaaagctg tccctcttga agctatgggt actccaaggt 1620
 tacaattgga tgtttatgta ccatagctat agatgtgat tgtgctataa ttgctgatgt 1680
 tgttggttgt agcatgagat attaaaagga gtacatgaag cgcattgcat gagttaact 1740
 tgtagctcct taatatttta ggtatttttc aattaataag ttcttggttg ttgggtaaaa 1800
 aaaaaaaaaa aa 1812

<210> 2

<211> 506

<212> PRT

5 <213> petunia

<400> 2

Met Met Leu Leu Thr Glu Leu Gly Ala Ala Thr Ser Ile Phe Leu Ile
 1 5 10 15

Ala His Ile Ile Ile Ser Thr Leu Ile Ser Lys Thr Thr Gly Arg His
 20 25 30

Leu Pro Pro Gly Pro Arg Gly Trp Pro Val Ile Gly Ala Leu Pro Leu
 35 40 45

Leu Gly Ala Met Pro His Val Ser Leu Ala Lys Met Ala Lys Lys Tyr
 50 55 60

ES 2 435 737 T3

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

ES 2 435 737 T3

Arg Asn Arg Arg Leu Leu Glu Ser Asp Ile Pro Asn Leu Pro Tyr Leu
 340 345 350
 Arg Ala Ile Cys Lys Glu Thr Phe Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu
 355 360 365
 Asn Leu Pro Arg Ile Ser Asn Glu Pro Cys Ile Val Asp Gly Tyr Tyr
 370 375 380
 Ile Pro Lys Asn Thr Arg Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg
 385 390 395 400
 Asp Pro Gln Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Asn Pro Glu Arg Phe
 405 410 415
 Leu Ser Gly Arg Asn Ser Lys Ile Asp Pro Arg Gly Asn Asp Phe Glu
 420 425 430
 Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Thr Arg Met
 435 440 445
 Gly Ile Val Met Val Glu Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His Ser Phe
 450 455 460
 Asp Trp Lys Leu Pro Ser Glu Val Ile Glu Leu Asn Met Glu Glu Ala
 465 470 475 480
 Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Glu Ala Met Val Thr
 485 490 495
 Pro Arg Leu Gln Leu Asp Val Tyr Val Pro
 500 505

<210> 3

<211> 1756

<212> ADN

5 <213> petunia

<400> 3

ttgaatccag ctctatctgg ctttagacaa tgggtgctact tagtgagctt gctgcagcaa 60
 ccttaatctt tctaacaaca catatcttca tttcaactct tctttctata actaacggcc 120
 ggcgtctccc gccagggcca agaggggtggc cgggtgatcgg agcacttcca cttttaggag 180
 ccatgccaca tgtttcctta gctaaaatgg caaaaaata tggagcaatc atgtatctca 240
 aagttggaac gtgtggcatg gtagttgctt ctaccctga tgctgctaaa gcgttcttga 300
 aaacacttga tctcaacttc tccaatcgtc cacctaatgc aggtgccacc cacttagcct 360

ES 2 435 737 T3

atggtgctca agacatggtt tttgcacatt atggaccaag atggaagttg ctaaggaaat 420
 taagcaactt acatatgcta ggggggaaag ccttagaaaa ttgggcaa at gttcgtgcca 480
 atgagctagg acacatgcta aaatcgatgt ttgatatgag cagagaaggg gagagagttg 540
 tgggtggcga gatgttgaca tttgccatgg cgaatatgat cggacaggtg atacttagca 600
 aaagagtatt tgtaaataaa ggtgttgagg taaatgaatt taaggacatg gtggtagagt 660
 taatgacaac agcagggtat tttaacattg gtgattttat tccttgttta gcttgatgg 720
 atttacaagg gatagaaaaa ggaatgaaac gtttacataa gaagtttgat gctttattga 780
 caaagatggt tgatgaacac aaagcaacta gctatgaacg taaggggaaa ccagattttc 840
 ttgattgtgt tatggaaaat agggacaatt ctgaaggaga aaggctcagt acaaccaaca 900
 tcaaagcact cttgctgaat ttgttcacag ctggtacaga cacttcttct agtgcaatag 960
 aatgggcact tgcagagatg atgaagaacc ctgccatttt aaagaaagca caaggagaaa 1020
 tggatcaagt cattggaaac aataggcgtc tgctcgaatc ggatatccca aatctccctt 1080
 acctccgagc aatttgcaaa gaaacatttc gaaagcacc ttctacacca ttaaatctcc 1140
 ctaggatctc gaacgaacca tgcattgtcg atggttatta catacaaaa aactactaggc 1200
 ttagtgtaa catatgggca attggaagag atcccgaagt ttgggagaac ccactagagt 1260
 tttatctga aaggttcttg agtggagaa actcgaagat tgatcctcga gggaacgact 1320
 ttgaattgat accatttggg gctggacgaa gaatttgtgc agggacaaga atgggaatcg 1380
 taatggtgga atatatatta ggaactttgg tccattcatt tgattggaaa ttaccaagtg 1440
 aagttattga gctaaatatg gaagaagctt ttggattagc tttgcagaaa gctgtccctc 1500
 ttgaagctat ggttactcca aggctgccta ttgatgttta tgcacctta gcttgaaaca 1560
 tgcctttacg ttggtttcag ttttgggtag tataatgttg tgggttttg ctatagaaat 1620
 attaataaat gctagtatct tgaaggcgcg tgcaggggga gggggttgc ttagatagta 1680
 gtaatatggt agccttcctt ttatttcttg tgattgtgag aatcttgata tgttttcttg 1740
 gaaaaaaaa aaaaaa 1756

<210> 4
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> petunia
 <400> 4

5

Met Val Leu Leu Ser Glu Leu Ala Ala Ala Thr Leu Ile Phe Leu Thr
 1 5 10 15
 Thr His Ile Phe Ile Ser Thr Leu Leu Ser Ile Thr Asn Gly Arg Arg
 20 25 30

ES 2 435 737 T3

Leu Pro Pro Gly Pro Arg Gly Trp Pro Val Ile Gly Ala Leu Pro Leu
 35 40 45
 Leu Gly Ala Met Pro His Val Ser Leu Ala Lys Met Ala Lys Lys Tyr
 50 55 60
 Gly Ala Ile Met Tyr Leu Lys Val Gly Thr Cys Gly Met Val Val Ala
 65 70 75 80
 Ser Thr Pro Asp Ala Ala Lys Ala Phe Leu Lys Thr Leu Asp Leu Asn
 85 90 95
 Phe Ser Asn Arg Pro Pro Asn Ala Gly Ala Thr His Leu Ala Tyr Gly
 100 105 110
 Ala Gln Asp Met Val Phe Ala His Tyr Gly Pro Arg Trp Lys Leu Leu
 115 120 125
 Arg Lys Leu Ser Asn Leu His Met Leu Gly Gly Lys Ala Leu Glu Asn
 130 135 140
 Trp Ala Asn Val Arg Ala Asn Glu Leu Gly His Met Leu Lys Ser Met
 145 150 155 160
 Phe Asp Met Ser Arg Glu Gly Glu Arg Val Val Val Ala Glu Met Leu
 165 170 175
 Thr Phe Ala Met Ala Asn Met Ile Gly Gln Val Ile Leu Ser Lys Arg
 180 185 190
 Val Phe Val Asn Lys Gly Val Glu Val Asn Glu Phe Lys Asp Met Val
 195 200 205
 Val Glu Leu Met Thr Thr Ala Gly Tyr Phe Asn Ile Gly Asp Phe Ile
 210 215 220
 Pro Cys Leu Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly Ile Glu Lys Gly Met Lys
 225 230 235 240
 Arg Leu His Lys Lys Phe Asp Ala Leu Leu Thr Lys Met Phe Asp Glu
 245 250 255
 His Lys Ala Thr Ser Tyr Glu Arg Lys Gly Lys Pro Asp Phe Leu Asp
 260 265 270
 Cys Val Met Glu Asn Arg Asp Asn Ser Glu Gly Glu Arg Leu Ser Thr
 275 280 285
 Thr Asn Ile Lys Ala Leu Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp
 290 295 300

ES 2 435 737 T3

Thr Ser Ser Ser Ala Ile Glu Trp Ala Leu Ala Glu Met Met Lys Asn
 305 310 315 320
 Pro Ala Ile Leu Lys Lys Ala Gln Gly Glu Met Asp Gln Val Ile Gly
 325 330 335
 Asn Asn Arg Arg Leu Leu Glu Ser Asp Ile Pro Asn Leu Pro Tyr Leu
 340 345 350
 Arg Ala Ile Cys Lys Glu Thr Phe Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu
 355 360 365
 Asn Leu Pro Arg Ile Ser Asn Glu Pro Cys Ile Val Asp Gly Tyr Tyr
 370 375 380
 Ile Pro Lys Asn Thr Arg Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg
 385 390 395 400
 Asp Pro Glu Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Tyr Pro Glu Arg Phe
 405 410 415
 Leu Ser Gly Arg Asn Ser Lys Ile Asp Pro Arg Gly Asn Asp Phe Glu
 420 425 430
 Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Thr Arg Met
 435 440 445
 Gly Ile Val Met Val Glu Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His Ser Phe
 450 455 460
 Asp Trp Lys Leu Pro Ser Glu Val Ile Glu Leu Asn Met Glu Glu Ala
 465 470 475 480
 Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Glu Ala Met Val Thr
 485 490 495
 Pro Arg Leu Pro Ile Asp Val Tyr Ala Pro Leu Ala
 500 505

<210> 5

<211> 2934

<212> ADN

5 <213> rosa

<400> 5

aagcttcagc aagagttgaa gaaatagga cagagccatc catgtgcttt gatgaatctg 60

atgggatata aatgtgaaa gattcacttg ctgatttadc cagaatttct tcatatagtg 120

ES 2 435 737 T3

aggagaatgt tgaagatct aatgatgagc actctgttaa actagacgga attcatgtgc 180
 agcacgagtg tcatgagggc agtgaagaag acaaacctga tggtaagagc ggtgagaatg 240
 cagttgatct ggctaatacat ggcattggctc gaactgattt ttgtcagata acagaagaga 300
 ttgagaatgg agtagtcatc actgagatga gcaacattgc caacctgat aaaactgata 360
 ttccaaacgg ggtgcctcaa aatgagactg atgatggatt taataacact caggatgatg 420
 ctaatacaaaa ggaagtgaca gaagagaatt ctgacagacg tgcgaaggaa gtgacagaag 480
 agaattctga caaagatggt ttgaagaata tccttgaatt ctcacgtgct tcttctgtgg 540
 tggatthtga aattccagtg ttggatgtga aatttacttc tcttgaaggt tgcagtgcca 600
 cttgttctct tgcagccctt ttgtctgaat cgccggaatc aatgactgaa gcacctgtg 660
 tgaggcaaat tgatgatgtg cccccggttg gtgaggagtc tagcttgatt ttggtggaag 720
 atcgggagcc ggttggctct actcctgatg gtaatttttc tgtggatatg gattactata 780
 gtgtagcaga acctttgagc acatgggatg cgaatctgca gtgtgaaaca tcaaatagcc 840
 atgagacttt tgctgcaagt ctcatttgat agcttctgtg ttaataactt tgttagtctg 900
 tacataaatt tgtctagaca agaattggtc gtgtactatc gtgtgttttt gccgtgcttt 960
 agtactcatg aaccaattca gagaaaactg gctgcatatt ttgaggagtc tctgaattct 1020
 tcaatgctca actgggatgc atgtaggtgg catatcactt cagggattct tctattcttt 1080
 aactttacgc atcttgacat tttgtatata acaaaatcag gtctattggg tgaaagtaat 1140
 tggctagaat ggaagctctc acggttttac cgcaggtaa tttcatagc tccacaagtg 1200
 aattgaaaat gctcataggc tttatgtttg tcctccacct ctggcgacga tgtttgttgg 1260
 ggagttact caaacctacc accaaaactcg aacctatctt ccataattta taatacaaat 1320
 ttgcatcat ttgttcatcc aattattgtg acactcggct accacccaaa atacgggtca 1380
 cagacccaaa cgtattgtca caacaaatcg tgtctctcgc attaaacaca gctagaaaga 1440
 agagttgaac ccacaattcg agcaccact acctatgtac gaagtcatga gttcagatca 1500
 ccataggggt agaagtgaat tcatttgatc atctttaaag aaataaaagg aagagttgaa 1560
 cccacaattg gctctgttcc caaaaagaac taatagttca gtgcaccgac gtgtatttgc 1620
 accgacataa atggattggt agattatatt aaatacactc ttaggttatt aataaaaata 1680
 ttaattataa atatcaaaag ttgagatcat cttataaatg ttgggtcagt tacaccgtcg 1740
 gtgcatagaa taatttccaa actatataat agccttcatt ttctgattta gctcatggga 1800
 catgattgct ataaataatt gtactcgtag aggcatactt gtgtcttttt atacagttgt 1860
 actgaagctc agaaaagttt atgaaggtga gaactgagaa gggcaaggca tttggtagtt 1920
 gaggtatatg agagcatgaa ccccatgcat tgcagctacc acctctcttt tttccttctt 1980
 cccatacaaa taaaaccaac tcttctcacc taagtctatc atctttattt atggcagctc 2040
 ttgcttaatt agctcatcta tattatatta tttatctata atatgtgtca ctctgtctac 2100
 ctaccagccc aaaataaaac tgataatagt caatttgatg atattttttg tttttgttt 2160

ES 2 435 737 T3

	tgttttgtct tttttgtatt gattttttta aaattaaaat gacttcattt tttgtttttg	2220
	tttttttttc tttttttttt tatagaaaaa ttggcaaact ttcattatct gttattgatg	2280
	acaattaagc cattaaaacc tataattaat tatctttcaa ttcgagtaaa tttaaaacgg	2340
	tgtaaaatta aaatatgatc gtattcttaa atgaataaaa ctcacttaat aatagtaata	2400
	cttgaatcac atctacgaac atagattcct ttcattccagt ctaaccatgt ttgaatatat	2460
	agagtttgat tatggttatg tctttgtcca cattttgggt tgtaaataaa tgtgcaacgg	2520
	aggatggta ctggtgctct atcaaattca agtttgaatt aaaagaaaa aaaaaagacg	2580
	atattttgtg cgctttgttt ggtaggtaaa acgagagaac aaacgcattc caaatcatgc	2640
	ggattttgat cggcaacaca caccacaaaa aaccgtacac gatgcacgtg ccatttgccg	2700
	ggggtttcta acaaggtaat tgggcaggca cgtgatcccc cagctacca cctctcgctt	2760
	cccttctcaa actccttttc catgtatata tacaaccctt tttctcagac cattatattc	2820
	taacattttt gctttgctat tgtaacgcaa caaaaactgc tcattccatc cttgttcctc	2880
	cccatTTTga tcttctctcg acccttctcc gagatgggta ccgagctcga attc	2934
	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> petunia	
	<400> 6	
	gttctcgagg aaagataata caat 24	
	<210> 7	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> petunia	
	<400> 7	
	caagatcgta ggactgcatg 20	
	<210> 8	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> crisantemo	
	<400> 8	
	gttaaggaag ccatgggtgt 20	
20	<210> 9	
	<211> 1648	
	<212> ADN	
	<213> viola	
	<400> 9	

ES 2 435 737 T3

agccaatatg gcaattccag tcaactgacct tgctgtcgcg gttatccttt tcttgatcac 60
 tcgcttccta gttcgttctc ttttcaagaa accaaccgga ccgctcccgc cgggtccttc 120
 aggctggccc ttggtgggcg cgctccctct cctagggccc atgcctcacg tcacactagc 180
 caacctcgct aaaaaatacg gtccgatcat gtacctaaaa atgggcacgt gcgacatggt 240
 ggtcgcgtcc actcccgact cggctcgagc cttctcaaaa accctagacc tcaacttctc 300
 cgaccgcccg cccaacgccg gcgccaccca tttggcgtac ggcgcgcagg acttggtctt 360
 cgcaagtac ggtccaaggt ggaagacctt aagaaaattg agcaacctcc acatgctagg 420
 cgggaaggcg ctggacgatt gggctcacgt gagggctaac gagctaggcc acatgcttaa 480
 cgccatgtgc gaggcgagcc ggtgcggaga gcccggtgtg ctggccgaga tgctcacgta 540
 cgccatggcc aacatgatcg gtcaagtgat actgagtcgg cgcgtgttcg tcaccaaaagg 600
 gacagagtcg aacgagttca aagatatggt ggtcgcgagttg atgacttccg cggggtattt 660
 caacattggt gacttcatac cgtcgattgc ttggatggat ttgcaagga tcgagcgagg 720
 gatgaagaaa ttgcacacga aattcgatgt tttgttgacg aagatgatga aggagcacag 780
 agcgacgagt catgagcgcg aagggaaatc ggatttcctc gacgtcctct tggaagaatg 840
 cgagaataca aatggcgaga agcttaatgt taccaacgtc aaagctgtcc tcttgaactt 900
 attcacggcg ggtacggaca catcttcaag cataatcgaa tgggcgttaa ccgaaatgat 960
 gaagaatccg acgatcttaa aaaagaccca agaagagatg gatcgagtca tcggtcgcga 1020
 tcggagattg ctcgaatccg acgtttcgaa actcccgtat ttacaagcca tagcgaaaga 1080
 aacatatcgt aaacacccat cgacacctct aaacctgccg aggattgcga tccaagcatg 1140
 tgaagtggat ggctactaca tcccaaaaga cacgaggctt agcgtcaaca tttgggcgat 1200
 cggctgggac ccaagtgttt gggagaatcc atcggagttc tcgcctgaaa gattcttgtc 1260
 tgaggagaat gggaaagatca gtccaggcgg gaatgatttt gagctgattc cgtttggagc 1320
 agggaggaga atttgtgctg ggacaaggat gggaatggtc cttgtaagtt atattttggg 1380
 cactttggtc cattcttttg attggaaatt accaaatggg gtcagtgaga ttaacatgga 1440
 tgagagtttt gggcttgcgt tgcaaaaggc cgtgcctctc tcggctacgg tcagtccacg 1500
 attggcccca agcgcgtacg ttatatgagc tgatgggctg ggcctgagcc caaacatatt 1560
 ggggtgtgttt tatctgtaat ttttaattatt ataaagttcg taattttgta tttatggtta 1620
 attatgagtt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1648

<210> 10
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> viola
 <400> 10

5

ES 2 435 737 T3

Met Ala Ile Pro Val Thr Asp Leu Ala Val Ala Val Ile Leu Phe Leu
1 5 10 15

Ile Thr Arg Phe Leu Val Arg Ser Leu Phe Lys Lys Pro Thr Gly Pro
20 25 30

Leu Pro Pro Gly Pro Ser Gly Trp Pro Leu Val Gly Ala Leu Pro Leu
35 40 45

Leu Gly Ala Met Pro His Val Thr Leu Ala Asn Leu Ala Lys Lys Tyr
50 55 60

Gly Pro Ile Met Tyr Leu Lys Met Gly Thr Cys Asp Met Val Val Ala
65 70 75 80

Ser Thr Pro Asp Ser Ala Arg Ala Phe Leu Lys Thr Leu Asp Leu Asn
85 90 95

Phe Ser Asp Arg Pro Pro Asn Ala Gly Ala Thr His Leu Ala Tyr Gly
100 105 110

Ala Gln Asp Leu Val Phe Ala Lys Tyr Gly Pro Arg Trp Lys Thr Leu
115 120 125

Arg Lys Leu Ser Asn Leu His Met Leu Gly Gly Lys Ala Leu Asp Asp
130 135 140

Trp Ala His Val Arg Ala Asn Glu Leu Gly His Met Leu Asn Ala Met
145 150 155 160

Cys Glu Ala Ser Arg Cys Gly Glu Pro Val Val Leu Ala Glu Met Leu
165 170 175

Thr Tyr Ala Met Ala Asn Met Ile Gly Gln Val Ile Leu Ser Arg Arg
180 185 190

Val Phe Val Thr Lys Gly Thr Glu Ser Asn Glu Phe Lys Asp Met Val
195 200 205

Val Glu Leu Met Thr Ser Ala Gly Tyr Phe Asn Ile Gly Asp Phe Ile
210 215 220

ES 2 435 737 T3

Pro Ser Ile Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly Ile Glu Arg Gly Met Lys
 225 230 235 240

Lys Leu His Thr Lys Phe Asp Val Leu Leu Thr Lys Met Met Lys Glu
 245 250 255

His Arg Ala Thr Ser His Glu Arg Glu Gly Lys Ser Asp Phe Leu Asp
 260 265 270

Val Leu Leu Glu Glu Cys Glu Asn Thr Asn Gly Glu Lys Leu Asn Val
 275 280 285

Thr Asn Val Lys Ala Val Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp
 290 295 300

Thr Ser Ser Ser Ile Ile Glu Trp Ala Leu Thr Glu Met Met Lys Asn
 305 310 320

Pro Thr Ile Leu Lys Lys Thr Gln Glu Glu Met Asp Arg Val Ile Gly
 325 330 335

Arg Asp Arg Arg Leu Leu Glu Ser Asp Val Ser Lys Leu Pro Tyr Leu
 340 345 350

Gln Ala Ile Ala Lys Glu Thr Tyr Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu
 355 360 365

Asn Leu Pro Arg Ile Ala Ile Gln Ala Cys Glu Val Asp Gly Tyr Tyr
 370 375 380

Ile Pro Lys Asp Thr Arg Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg
 385 390 395 400

Asp Pro Ser Val Trp Glu Asn Pro Ser Glu Phe Ser Pro Glu Arg Phe
 405 410 415

Leu Ser Glu Glu Asn Gly Lys Ile Ser Pro Gly Gly Asn Asp Phe Glu
 420 425 430

Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Thr Arg Met
 435 440 445

Gly Met Val Leu Val Ser Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His Ser Phe
 450 455 460

Asp Trp Lys Leu Pro Asn Gly Val Ser Glu Ile Asn Met Asp Glu Ser
 465 470 475 480

Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Ser Ala Thr Val Ser
 485 490 495

Pro Arg Leu Ala Pro Ser Ala Tyr Val Ile
 500 505

<210> 11

<211> 1782

5 <212> ADN

<213> viola

<220>

<221> misc_feature

<222> (307)..(307)

10 <223> n = cualquier nucleótido

<400> 11

ES 2 435 737 T3

bgacaacatg gcaattctag tcaccgactt cgttgtcgcg gctataatth tcttgatcac 60
 tcggttctta gttcgttctc ttttcaagaa accaaccgca ccgctcccc cgggtcctct 120
 cggttggccc ttggtggcg ccctccctct cctagggccc atgcctcacg tcgcactagc 180
 caaactcgct aagaagtatg gtccgatcat gcacctaaaa atgggcacgt gcgacatggt 240
 ggtcgcgtcc acccccgagt cggctcgagc cttcctcaaa acgctagacc tcaacttctc 300
 caaccgncca cccaacgcgg gcgcatccca cctagcgtac ggcgcgcagg acttagtctt 360
 cgccaagtac ggtccgaggt ggaagacttt aagaaaattg agcaacctcc acatgctagg 420
 cgggaaggcg ttggatgatt gggcaaatgt gagggtcacc gagctaggcc acatgcttaa 480
 agccatgtgc gaggcgagcc ggtgcgggga gcccggtggt ctggccgaga tgctcacgta 540
 cgccatggcg aacatgatcg gtcaagtgat atcagccgg cgcgtgttcg tgaccaaagg 600
 gaccgagtct aacgagttca aagacatggt ggtcagattg atgacgtccg ccgggtactt 660
 caacatcggg gacttcatac cctcgatcgc ttggatggat ttgcaaggga tcgagcgagg 720
 gatgaagaag ctgcacacga agtttgatgt gttattgacg aagatggtga aggagcatag 780
 agcgacgagt catgagcgca aagggaaagg agatttctc gacgttctct tggagaagt 840
 cgacaataca aatggggaga agcttagtat taccaatc aaagctgtcc ttttgaatct 900
 attcacggcg ggcacggaca catcttcgag cataatcga tgggcgttaa cggagatgat 960
 caagaatccg acgatcttaa aaaaggcgca agaggagatg gatcagatca tcggtcgtga 1020
 tcggaggctg ctgaaatcgg acatatcgag cctcccgtac ctacaagcca ttgctaaaga 1080
 aacgatcgc aaacaccgt cgacgcctct caacttgcg aggattgca tccaagcatg 1140
 tgaagttgat ggctactaca tccctaagga cgcgaggctt agcgtgaaca tttggcgat 1200
 cggtcgggac ccgaatgttt gggagaatcc gttggagttc ttgccgaaa gattcttgc 1260
 tgaagagaat gggaaatca atcccgttg gaatgattt aagctgattc cgtttggagc 1320
 cgggaggaga atttgtcgg ggacaaggat gggaaatggtc cttgtaagtt atattttggg 1380
 cactttggtc cattctttt attgaaatt accaaatggt gtcgctgagc ttaatatgga 1440
 tgaaagttt gggcttgc atgcaaaaggc cgtgccgctc tcggccttg tcagcccacg 1500
 gttggcctca aaccgtacg caacctgagc taatgggctg ggcctagttt tgtgggcct 1560
 aatttagaga cttttgtgtt ttaaggtgtg tactttatta attgggtgct taaatgtgtg 1620
 ttttaatttg tatttatggt taattatgac tttattgat aattattat tttcccttc 1680
 tgggtatth atccatthaa ttttcttca gaattatgat catagttatc agaataaaat 1740
 tgaaaataat gaatcggaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aa 1782

<210> 12
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> viola
 <400> 12

5

ES 2 435 737 T3

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

ES 2 435 737 T3

Trp Ala Asn Val Arg Val Thr Glu Leu Gly His Met Leu Lys Ala Met
 145 150 155 160
 Cys Glu Ala Ser Arg Cys Gly Glu Pro Val Val Leu Ala Glu Met Leu
 165 170 175
 Thr Tyr Ala Met Ala Asn Met Ile Gly Gln Val Ile Leu Ser Arg Arg
 180 185 190
 Val Phe Val Thr Lys Gly Thr Glu Ser Asn Glu Phe Lys Asp Met Val
 195 200 205
 Val Glu Leu Met Thr Ser Ala Gly Tyr Phe Asn Ile Gly Asp Phe Ile
 210 215 220
 Pro Ser Ile Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly Ile Glu Arg Gly Met Lys
 225 230 235 240
 Lys Leu His Thr Lys Phe Asp Val Leu Leu Thr Lys Met Val Lys Glu
 245 250 255
 His Arg Ala Thr Ser His Glu Arg Lys Gly Lys Ala Asp Phe Leu Asp
 260 265 270
 Val Leu Leu Glu Glu Cys Asp Asn Thr Asn Gly Glu Lys Leu Ser Ile
 275 280 285
 Thr Asn Ile Lys Ala Val Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp
 290 295 300
 Thr Ser Ser Ser Ile Ile Glu Trp Ala Leu Thr Glu Met Ile Lys Asn
 305 310 315 320
 Pro Thr Ile Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Met Asp Arg Val Ile Gly
 325 330 335
 Arg Asp Arg Arg Leu Leu Glu Ser Asp Ile Ser Ser Leu Pro Tyr Leu
 340 345 350
 Gln Ala Ile Ala Lys Glu Thr Tyr Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu
 355 360 365
 Asn Leu Pro Arg Ile Ala Ile Gln Ala Cys Glu Val Asp Gly Tyr Tyr
 370 375 380
 Ile Pro Lys Asp Ala Arg Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg
 385 390 395 400
 Asp Pro Asn Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Leu Pro Glu Arg Phe
 405 410 415

ES 2 435 737 T3

Leu Ser Glu Glu Asn Gly Lys Ile Asn Pro Gly Gly Asn Asp Phe Lys
 420 425 430

Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Thr Arg Met
 435 440 445

Gly Met Val Leu Val Ser Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His Ser Phe
 450 455 460

Asp Trp Lys Leu Pro Asn Gly Val Ala Glu Leu Asn Met Asp Glu Ser
 465 470 475 480

Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Ser Ala Leu Val Ser
 485 490 495

Pro Arg Leu Ala Ser Asn Pro Tyr Ala Thr
 500 505

<210> 13

<211> 1659

<212> ADN

5 <213> salvia

<400> 13

```

catggaagcc caagaaaata tgttggtgat tgctagggca cttggttag catccttact    60
ctacattttg atccgtatgt ttatctcaaa attgagcacc accggccacc ctctgcccc    120
ggggccgagg ggctttctag tgggggctc ccttccttg ctgggcgaca tgccacatgt    180
cgccctagca aaaatggcca aaacttacgg cccgatcatg tacttgaaaa tgggcacagt    240
cggcatggtc gtggcgctca cgccagacgc ggcgaggcg ttcttaaaaa cccacgacgc    300
taatttctcg aaccggccgg tcaacgcggg tgccaccatc ctggcataca atgcccagga    360
catggtgttt gccccgtacg gcccgaagtg gagactgctg aggaagctga gcagtctcca    420
catgctgggg agcaaggccc tggaggagtg ggctgacgtc cggacctcgg aggtggggca    480
catgctggcg gcgatgcacg aggccagccg cctgggcgag gccgtggggt tgccggagat    540
gctggtgtac gcgacggcga acatgatcgg gcagggtgata ttgagccgga gagttttcgt    600
gacgaaaggg aaggagatga atgaattcaa ggaaatggtg gtggagctca tgaccacagc    660
tggctatttc aacattggtg atttcattcc atggcttgct tggatggatt tgcaggggat    720
tgagagaggg atgaagaaac tgcacaagaa gtgggaccgc ttgatcggta agatgctgga    780
tgatcgattg aatcaacct acaaacgcaa cgacaagcca gatcttcttg attctctctt    840
ggcaaatcat gatgatgaga gtaaggatga tgatgaggat tgcaagctca ccaccaccaa    900
tattaaagcc cttttactga atttatttac tgcagggaca gacacatcgt cgagcataat    960
agaatgggca ttagcggaga tgatcaagaa tccaagcatc caaaaaaggg ctccaaca    1020
    
```

ES 2 435 737 T3

gatggacaga gtcacgga gagagcggc tttgctcga tccgacatcc caaatctgcc 1080
 atacctcaaa gccatatgca aagaggcata ccgaaaacac ccttccacgc cactaaacct 1140
 gcctcggatc tccacggatg catgcgtcgt cgatggctac cacatcccca agaacacgag 1200
 gttgagcgtc aacatctggg ccataggccg agatcccgc gtttgggaga atccccttga 1260
 cttcaacctt gacaggttta tgcaggggtt gcaggggatt gagcccggag ggaatcactt 1320
 cgagctcatt ccctttgggg cggggcgcag gatctgcgcc ggcagcagaa tggggattgt 1380
 aatagtggag tatttctggg cgacactcgt gcactctttc gaatgggatt tgccggccgg 1440
 ctgagcggag atggacatgg aggaggtggt cgggctggcc ttgcagaaag ctgtaccact 1500
 tgctgctagg ctactccta ggttgccctt acattgctat gcacctcctt ctatttaatt 1560
 tgcataatita catatggtgt gttacattga gcccttgcac atgttgtatc caacctatct 1620
 tataacttgt gcatgaaatt gaaaaaaaa aaaaaaaaa 1659

<210> 14
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> salvia
 <400> 14

5

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

ES 2 435 737 T3

Tyr Gly Pro Lys Trp Arg Leu Leu Arg Lys Leu Ser Ser Leu His Met
 130 135 140

Leu Gly Ser Lys Ala Leu Glu Glu Trp Ala Asp Val Arg Thr Ser Glu
 145 150 155 160

Val Gly His Met Leu Ala Ala Met His Glu Ala Ser Arg Leu Gly Glu
 165 170 175

Ala Val Gly Leu Pro Glu Met Leu Val Tyr Ala Thr Ala Asn Met Ile
 180 185 190

Gly Gln Val Ile Leu Ser Arg Arg Val Phe Val Thr Lys Gly Lys Glu
 195 200 205

Met Asn Glu Phe Lys Glu Met Val Val Glu Leu Met Thr Thr Ala Gly
 210 215 220

Tyr Phe Asn Ile Gly Asp Phe Ile Pro Trp Leu Ala Trp Met Asp Leu
 225 230 235 240

Gln Gly Ile Glu Arg Gly Met Lys Lys Leu His Lys Lys Trp Asp Arg
 245 250 255

Leu Ile Gly Lys Met Leu Asp Asp Arg Leu Lys Ser Thr Tyr Lys Arg
 260 265 270

Asn Asp Lys Pro Asp Leu Leu Asp Ser Leu Leu Ala Asn His Asp Asp
 275 280 285

Glu Ser Lys Asp Asp Asp Glu Asp Cys Lys Leu Thr Thr Thr Asn Ile
 290 295 300

Lys Ala Leu Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser
 305 310 315 320

Ser Ile Ile Glu Trp Ala Leu Ala Glu Met Ile Lys Asn Pro Ser Ile
 325 330 335

Gln Lys Arg Ala His Gln Glu Met Asp Arg Val Ile Gly Arg Glu Arg
 340 345 350

Arg Leu Leu Glu Ser Asp Ile Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Lys Ala Ile
 355 360 365

Cys Lys Glu Ala Tyr Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu Asn Leu Pro
 370 375 380

Arg Ile Ser Thr Asp Ala Cys Val Val Asp Gly Tyr His Ile Pro Lys
 385 390 395 400

ES 2 435 737 T3

Asn Thr Arg Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asp
 405 410 415

Val Trp Glu Asn Pro Leu Asp Phe Asn Pro Asp Arg Phe Met Ser Gly
 420 425 430

Leu Gln Gly Ile Glu Pro Gly Gly Asn His Phe Glu Leu Ile Pro Phe
 435 440 445

Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Ser Arg Met Gly Ile Val Ile
 450 455 460

Val Glu Tyr Leu Leu Ala Thr Leu Val His Ser Phe Glu Trp Asp Leu
 465 470 475 480

Pro Ala Gly Ser Ala Glu Met Asp Met Glu Glu Val Phe Gly Leu Ala
 485 490 495

Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Ala Ala Arg Leu Thr Pro Arg Leu Pro
 500 505 510

Ser His Cys Tyr Ala Pro Pro Ser
 515 520

<210> 15
 <211> 1617
 <212> ADN
 <213> salvia
 <400> 15

5

```

agatagtaag catggaagcc caagaaaata tgttgttgat tgctagggca cttggtgtag      60
catccttact ctacattttg atccgtatgt ttatctcaaa attgagcacc cccggccacc      120
ctctgcccc  ggggcccagg ggctttccag tgggtgggctc ccttcccttg ctgggcgaca      180
tgccacatgt tgccctagca aaaatggcca aaacttatgg cccgatcatg tacttgaaaa      240
tgggcacagt cggcatggtc gtggcgctca cgccagacgc ggcgcgggcg ttcctaaaaa      300
cccaggacgc taatttctct aaccggccgg tcaacgcggg tgccaccatc ctggcataca      360
atgccagga catggtgttt gccccgtacg gcccgaagtg gagattgctg aggaagctga      420
gcagtctcca catgctgggg agcaaggccc tggaggagtg ggccgacgtc cggacctcgg      480
aggtggggca catgctggcg gcgatgcacg aggccagccg cctggacgag gccgtggggt      540
tgccggagat gctggtgtac gcgacggcga acatgatcgg gaaggtgata ttgagccgga      600
gagttttcgt gacgaaaggg aaggagatga atgagttcaa ggaaatggtg gtggagctca      660
tgaccacagc tggctatttc aacattgggt atttcattcc atggcttgct tggatggatt      720
tgcaggggat tgagagaggg atgaagaaac tgcacaagaa gtgggaccgc ttgatcggta      780
    
```

ES 2 435 737 T3

agatgctgga tgatcgattg aatcaacct acaaacgcaa cgacaagcca gatcttcttg 840
 attctctctt ggcaaatcat gatgatgaga gtaaggatga tgatgaggat tgcaagctca 900
 ccaccaccaa tattaagacc cttttactga atttatttac tgcagggaca gacacatcgt 960
 cgagcataat agaatgggca ctagcggaga tgatcaagaa tccaagcatc caaaaaaggg 1020
 ctcaccaaga gatggacaga gtcacggga gagagcggcg tttgctcgaa tccgacatcc 1080
 caaatctgcc atacctcaaa gccatatgca aagaggcata ccgaaaacac ccttccacgc 1140
 cactaaacct gcctcggatc tccacggatg catgcgtcgt cgatggctac cacatcccca 1200
 agaacacgag gttgagcgtc aacatctggg ccataggccg agatcccgcac gtttgggaga 1260
 atccccttga cttcaacct gacaggttta tgcaggggtt gcaggggatt gagcccggag 1320
 ggaatcactt cgagctcatt ccctttgggg cggggcgag gatctgcgcc ggcagcagaa 1380
 tggggattgt aatagtgag tatttgctgg cgacactcgt gcactctttc gaatgggatt 1440
 tgccagccgg ctcagcggag atggacatgg aggaggtgtt cgggctggcc ttgcagaaag 1500
 ctgtaccact tgctgctagg ctcactccta ggttgccttc acattgctat gcacctcctt 1560
 ctatttaatt tgcataatata tatatgttgt gttacattga aaaaaaaaaa aaaaaaa 1617

<210> 16
 <211> 518
 <212> PRT
 <213> salvia
 <400> 16

5

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

ES 2 435 737 T3

Ile Leu Ala Tyr Asn Ala Gln Asp Met Val Phe Ala Pro Tyr Gly Pro
 115 120 125

Lys Trp Arg Leu Leu Arg Lys Leu Ser Ser Leu His Met Leu Gly Ser
 130 135 140

Lys Ala Leu Glu Glu Trp Ala Asp Val Arg Thr Ser Glu Val Gly His
 145 150 155 160

Met Leu Ala Ala Met His Glu Ala Ser Arg Leu Asp Glu Ala Val Gly
 165 170 175

Leu Pro Glu Met Leu Val Tyr Ala Thr Ala Asn Met Ile Gly Lys Val
 180 185 190

Ile Leu Ser Arg Arg Val Phe Val Thr Lys Gly Lys Glu Met Asn Glu
 195 200 205

Phe Lys Glu Met Val Val Glu Leu Met Thr Thr Ala Gly Tyr Phe Asn
 210 215 220

Ile Gly Asp Phe Ile Pro Trp Leu Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly Ile
 225 230 235 240

Glu Arg Gly Met Lys Lys Leu His Lys Lys Trp Asp Arg Leu Ile Gly
 245 250 255

Lys Met Leu Asp Asp Arg Leu Lys Ser Thr Tyr Lys Arg Asn Asp Lys
 260 265 270

Pro Asp Leu Leu Asp Ser Leu Leu Ala Asn His Asp Asp Glu Ser Lys
 275 280 285

Asp Asp Asp Glu Asp Cys Lys Leu Thr Thr Thr Asn Ile Lys Ala Leu
 290 295 300

Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ser Ile Ile
 305 310 315 320

Glu Trp Ala Leu Ala Glu Met Ile Lys Asn Pro Ser Ile Gln Lys Arg
 325 330 335

Ala His Gln Glu Met Asp Arg Val Ile Gly Arg Glu Arg Arg Leu Leu
 340 345 350

Glu Ser Asp Ile Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Lys Ala Ile Cys Lys Glu
 355 360 365

Ala Tyr Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu Asn Leu Pro Arg Ile Ser
 370 375 380

ES 2 435 737 T3

Thr Asp Ala Cys Val Val Asp Gly Tyr His Ile Pro Lys Asn Thr Arg
 385 390 395 400
 Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asp Val Trp Glu
 405 410 415
 Asn Pro Leu Asp Phe Asn Pro Asp Arg Phe Met Ser Gly Leu Gln Gly
 420 425 430
 Ile Glu Pro Gly Gly Asn His Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly
 435 440 445
 Arg Arg Ile Cys Ala Gly Ser Arg Met Gly Ile Val Ile Val Glu Tyr
 450 460
 Leu Leu Ala Thr Leu Val His Ser Phe Glu Trp Asp Leu Pro Ala Gly
 465 470 475 480
 Ser Ala Glu Met Asp Met Glu Glu Val Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys
 485 490 495
 Ala Val Pro Leu Ala Ala Arg Leu Thr Pro Arg Leu Pro Ser His Cys
 500 505 510

Tyr Ala Pro Pro Ser Ile
 515

<210> 17

<211> 1730

<212> ADN

5 <213> sollya

<220>

<221> misc_feature

<222> (1372)..(1372)

<223> n = cualquier nucleótido

10 <400> 17

gatggctact acctagaat tcattctatg cttcaccatt actgcacttc cttttctata 60
 ttgcatactt aacatgcgca tcctccttaa ccgtcaccg aggtcactcc caccaggtcc 120
 aagaccatgg cctattgtag gaaacctccc acaccttggc accaagccac accactccat 180
 agctgccatg gctcggaat acggctcccct cctgcacctc cgcattgggca tcgtgcacgt 240
 ggtggttggc gcctctgctg atgtggcggc acagttcttg aagaatgatg ccaacttctc 300

ES 2 435 737 T3

tagccggcca ccgaattctg gtgctaagca tatggcttat aactatcacg acatggtggt 360
 tgcaccctac ggtccaaggt ggcgcatggt gaggaaaatt tgtgcccttc atatattctc 420
 cgctaaggct ctcgatgatt ttcacgcggt gcgtgaggag gaggttgccca tactcgcgag 480
 gaccctagca cacgcaggcc aaaagccggt gaatttgggg cagttgttct ctacgtgtaa 540
 tgctaatgcg ctatcagtgc tgatgctagg caggaggttg ttcagcacag aagttgattc 600
 aaaagcatat gatttcaaac aaatggtggt ggagctgatg actctagccg gtgagttaa 660
 cgtcagtgat ttcatcccac ccctcgagtg gctagacttg caaggcgtgg cagcgaata 720
 gaagaacgtg cacaatcgat tcgatgctgt tctgaatgta attttggagg agcataagct 780
 gaaacttaat aatagtggac atggggaaca aaaacatatg gacttgttga gtacgttgat 840
 tttgcttaag gatgatgctg atagtgaggg aggaaaactc actgatactg aaatcaaagc 900
 gctgcttttg aatttgtttt ctgctgggac ggacacttca tccagcaca tagaatgggt 960
 tatagctgag cttatacgca atcctaaaat cttagcccaa gcccaaagag agttggactt 1020
 ggtggttggc ccaaatagac ttgtaacgga tttggacctc aaacaattaa cctacctaca 1080
 agccatcgtc aaagaaacct ttcggctaca tcttgctacc ccactttcac ttccacggat 1140
 cgcaaccgaa agctgtgaaa tcaacggggt ttacattcca aagggtcaa cacttctcgt 1200
 taacatatgg gccatagcc gtgatccaaa cacttgggct gaaccattgg tattccgacc 1260
 tgaacgattc ttatcggatg gtgaaagtcc taatgttgat gttaaaggac gtaatttga 1320
 attgatacca tttggggcgg ggcgaagaat ttgtgctggg atgaactttg gnctacgat 1380
 ggtccagtta gttactgcaa cgtaattca tgcatttaac tgggagttgc cagaagggga 1440
 attgccagaa aatatgaata tggaggaaga ctatgggatt agcttgcaac ggacagtgcc 1500
 attagtgtt catccaaagc ccagactaga ccatgaagtt tatcagtccc atggagttgt 1560
 aaactgagta cattcatgaa ctgaccaga agctgtcaga tgcgtctta tattgcctta 1620
 tgtagtgcga cccttgctg ttttttatgt attgtttgt acaaggttga agcccgtgcg 1680
 ggcgatggac aattttataa gttaatttta ataaaaaaaa aaaaaaaaaa 1730

<210> 18
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> sollya
 <400> 18

5

Met Ala Thr Thr Leu Glu Phe Ile Leu Cys Phe Thr Ile Thr Ala Leu
 1 5 10 15

Pro Phe Leu Tyr Cys Ile Leu Asn Met Arg Ile Leu Leu Asn Arg His
 20 25 30

ES 2 435 737 T3

Pro Arg Ser Leu Pro Pro Gly Pro Arg Pro Trp Pro Ile Val Gly Asn
 35 40 45
 Leu Pro His Leu Gly Thr Lys Pro His His Ser Ile Ala Ala Met Ala
 50 55 60
 Arg Lys Tyr Gly Pro Leu Leu His Leu Arg Met Gly Ile Val His Val
 65 70 75 80
 Val Val Ala Ala Ser Ala Asp Val Ala Ala Gln Phe Leu Lys Asn Asp
 85 90 95
 Ala Asn Phe Ser Ser Arg Pro Pro Asn Ser Gly Ala Lys His Met Ala
 100 105 110
 Tyr Asn Tyr His Asp Met Val Phe Ala Pro Tyr Gly Pro Arg Trp Arg
 115 120 125
 Met Leu Arg Lys Ile Cys Ala Leu His Ile Phe Ser Ala Lys Ala Leu
 130 135 140
 Asp Asp Phe His Arg Val Arg Glu Glu Glu Val Ala Ile Leu Ala Arg
 145 150 155 160
 Thr Leu Ala His Ala Gly Gln Lys Pro Val Asn Leu Gly Gln Leu Phe
 165 170 175
 Ser Thr Cys Asn Ala Asn Ala Leu Ser Val Leu Met Leu Gly Arg Arg
 180 185 190
 Leu Phe Ser Thr Glu Val Asp Ser Lys Ala Tyr Asp Phe Lys Gln Met
 195 200 205
 Val Val Glu Leu Met Thr Leu Ala Gly Glu Phe Asn Val Ser Asp Phe
 210 215 220
 Ile Pro Pro Leu Glu Trp Leu Asp Leu Gln Gly Val Ala Ala Lys Met
 225 230 235 240
 Lys Asn Val His Asn Arg Phe Asp Ala Phe Leu Asn Val Ile Leu Glu
 245 250 255
 Glu His Lys Leu Lys Leu Asn Asn Ser Gly His Gly Glu Gln Lys His
 260 265 270
 Met Asp Leu Leu Ser Thr Leu Ile Leu Leu Lys Asp Asp Ala Asp Ser
 275 280 285
 Glu Gly Gly Lys Leu Thr Asp Thr Glu Ile Lys Ala Leu Leu Leu Asn
 290 295 300

ES 2 435 737 T3

Leu Phe Ser Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Trp Val
 305 310 315 320

Ile Ala Glu Leu Ile Arg Asn Pro Lys Ile Leu Ala Gln Ala Gln Arg
 325 330 335

Glu Leu Asp Leu Val Val Gly Pro Asn Arg Leu Val Thr Asp Leu Asp
 340 345 350

Leu Lys Gln Leu Thr Tyr Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Thr Phe Arg
 355 360 365

Leu His Pro Ala Thr Pro Leu Ser Leu Pro Arg Ile Ala Thr Glu Ser
 370 375 380

Cys Glu Ile Asn Gly Phe Tyr Ile Pro Lys Gly Ser Thr Leu Leu Val
 385 390 395 400

Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asn Thr Trp Ala Glu Pro Leu
 405 410 415

Val Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Ser Asp Gly Glu Ser Pro Asn Val
 420 425 430

Asp Val Lys Gly Arg Asn Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg
 435 440 445

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

Thr Ala Thr Leu Ile His Ala Phe Asn Trp Glu Leu Pro Glu Gly Glu
 465 470 475 480

Leu Pro Glu Asn Met Asn Met Glu Glu Asp Tyr Gly Ile Ser Leu Gln
 485 490 495

Arg Thr Val Pro Leu Val Val His Pro Lys Pro Arg Leu Asp His Glu
 500 505 510

Val Tyr Gln Ser His Gly Val Val Asn
 515 520

<210> 19

<211> 37

<212> ADN

5 <213> petunia

<400> 19

aaaatcgata ccatggtctt ttttctttg tctatac 37

<210> 20

<211> 1748

10 <212> ADN

<213> clitoria

<400> 20

ES 2 435 737 T3

```

ggatccaaca atgttccttc taagagaaat tggggatca attttgatct tcatgatcac      60
ccatcttgtg attcgtttag ttctgaaaga gaaggaacaa cggaaacttc caccagggcc     120
aaaaggttgg ccaattgtgg gtgcaactgc tctaattggga agcatgcccc atgtcacact     180
ctcagaaatg gctaaaaaat atggacctgt tatgtacctt aaaatgggca caaacaacat     240
ggctgtagca tctactccct ctgcagctcg tgcattcctc aaaacccttg accttaactt     300
ctccaatcgc cccccaaatg ctggggcaac tcacttagct tatgatgcc aggacatggt      360
gtttgctgat tacggatcta ggtggaagtt gcttagaaaa ctaagcaact tacacatgct     420
tggaggaaag gctcttgaag aatggtcaca agttagagag attgagatgg ggcacatgct     480
tcgtgcaatg tacgattgta gtggtggcgg tgacggcaac aacgacaatg atggcaacaa     540
gaaaaagggg actcgtcatg agcctattgt ggtggctgaa atgttaacat acgcgatggc     600
caacatgata ggtcaagtga tcttgagccg tcgtgtattc gagacaaagg gttcggaatc     660
gaacgagttt aaggacatgg tggttcagct catgaccggt gctggctact ttaacattgg     720
tgattttatt cccttttgg ctcgcttca cctccaaggc atcgagcgtg gcatgaaaac     780
tttgcataac aagttcgatg tttgttgac gacaatgatt catgagcatg tggcttctgc     840
tcataaacga aagggtaaac ctgatttctt ggatgttctc atggctcatc ataccaacga     900
gtctcatgaa ctgtcgtca ccaacatcaa agcactcctc ttaaatctat ttactgcagg     960
cacagataca tcatcaagta tcatagagtg ggcactagca gagatgttga taaacccaaa    1020
aatcatgaag aaagtgcag aggaaatgga caaagtgata ggcaaggata gaaggctaaa    1080
agaatccgac atagaaaatc tcccttactt gcaggcaatt tgcaaagaga catatagaaa    1140
gcacccatca acgccactca acttgccatg aatctcatcc caagcatgcc aagtgaatgg    1200
ctactacatc ccaaagaaca ctaggcttag tgtcaacatc tgggccattg gaagagaccc    1260
taatgtgtgg gagaaccctt tggagttcaa tccagagagg tttatgggtg ccaataagac    1320
tattgatcca cgtgggaatg attttgagct cattccattt ggtgctggga gaaggatttg    1380
tgctgggaca aggatgggga ttgtgttgg tcaatacatt ttgggcactt tggtagattc    1440
ctttgattgg aagttaccaa atggtgttgt ggagttgaac atggaagaga cttttggcct    1500
tgctttgcag aaaaagatac cactttctgc tttgattacc cctaggttgc cccaactgc    1560
ttacaatggt attaattcct aatttgatct tagtactatg gtaagttata accaaataag    1620
taattactgt ttgtattaat gtttctgaat tccgagtgtc tttctttggt gtatgggaaa    1680
tctgtacca ccacctggga ttaatgtttt aattaatttt catatgttta aaaaaaaaaa    1740
aaaaaaaaa                                     1748
<210> 21
<211> 525
<212> PRT
<213> clitoria
<400> 21

```

5

ES 2 435 737 T3

Met Phe Leu Leu Arg Glu Ile Gly Val Ser Ile Leu Ile Phe Met Ile
1 5 10 15

Thr His Leu Val Ile Arg Leu Val Leu Lys Glu Lys Glu Gln Arg Lys
20 25 30

Leu Pro Pro Gly Pro Lys Gly Trp Pro Ile Val Gly Ala Leu Pro Leu
35 40 45

Met Gly Ser Met Pro His Val Thr Leu Ser Glu Met Ala Lys Lys Tyr
50 55 60

Gly Pro Val Met Tyr Leu Lys Met Gly Thr Asn Asn Met Ala Val Ala
65 70 75 80

Ser Thr Pro Ser Ala Ala Arg Ala Phe Leu Lys Thr Leu Asp Leu Asn
85 90 95

Phe Ser Asn Arg Pro Pro Asn Ala Gly Ala Thr His Leu Ala Tyr Asp
100 105 110

Ala Gln Asp Met Val Phe Ala Asp Tyr Gly Ser Arg Trp Lys Leu Leu
115 120 125

Arg Lys Leu Ser Asn Leu His Met Leu Gly Gly Lys Ala Leu Glu Glu
130 135 140

Trp Ser Gln Val Arg Glu Ile Glu Met Gly His Met Leu Arg Ala Met
145 150 155 160

Tyr Asp Cys Ser Gly Gly Gly Asp Gly Asn Asn Asp Asn Asp Gly Asn
165 170 175

Lys Lys Lys Gly Thr Arg His Glu Pro Ile Val Val Ala Glu Met Leu
180 185 190

ES 2 435 737 T3

Thr Tyr Ala Met Ala Asn Met Ile Gly Pro Ser Asp Leu Glu Pro Ser
 195 200 205
 Cys Ile Pro Arg Gln Arg Val Arg Asn Arg Thr Ser Leu Arg Thr Trp
 210 215 220
 Trp Phe Lys Leu Met Thr Val Ala Gly Tyr Phe Asn Ile Gly Asp Phe
 225 230 235 240
 Phe Pro Phe Leu Ala Arg Arg Arg Arg Gln Gly Ile Glu Arg Gly Met
 245 250 255
 Lys Thr Leu His Asn Lys Lys Asp Asp Leu Leu Thr Thr Met Ile His
 260 265 270
 Glu His Val Ala Ser Ala His Lys Arg Lys Gly Lys Pro Pro Phe Leu
 275 280 285
 Asp Val Leu Met Ala His His Thr Asn Glu Ser His Glu Leu Ser Leu
 290 295 300
 Thr Asn Ile Lys Ala Leu Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp
 305 310 315 320
 Thr Ser Ser Ser Ile Ile Glu Trp Ala Leu Ala Glu Met Leu Ile Asn
 325 330 335
 Pro Lys Ile Met Lys Lys Val His Glu Glu Met Asp Lys Val Ile Gly
 340 345 350
 Lys Asp Arg Arg Leu Lys Glu Ser Asp Ile Glu Asn Leu Pro Tyr Leu
 355 360 365
 Gln Ala Ile Cys Lys Glu Thr Tyr Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu
 370 375 380
 Asn Leu Pro Arg Ile Ser Ser Gln Ala Cys Gln Val Asn Gly Tyr Tyr
 385 390 395 400
 Ile Pro Lys Asn Thr Arg Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg
 405 410 415
 Asp Pro Asn Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Asn Pro Glu Arg Phe
 420 425 430
 Met Gly Ala Asn Lys Thr Ile Asp Pro Arg Gly Asn Asp Phe Glu Leu
 435 440 445
 Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Thr Arg Met Gly
 450 455 460

ES 2 435 737 T3

Ile Val Leu Val Gln Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His Ser Phe Asp
 465 470 475 480

Trp Lys Leu Pro Asn Gly Val Val Glu Leu Asn Met Glu Glu Thr Phe
 485 490 495

Gly Leu Ala Leu Gln Lys Lys Ile Pro Leu Ser Ala Leu Ile Thr Pro
 500 505 510

Arg Leu Pro Pro Thr Ala Tyr Asn Val Ile Asn Ser Ser
 515 520 525

<210> 22

<211> 1684

<212> ADN

5 <213> genciana

<400> 22

tacaaatgtc acccatttac accaccctca cattacacct tgctacagct cttttctct 60
 tctttcatgt ccagaaactt gttcactacc tccacggcaa agccaccggc caccgctgcc 120
 gccgccttcc accagggccc accggatggc caatcctagg tgcccttctt cttttgggca 180
 acatgccaca tgttactttt gctaacatgg cgaaaaaata tggctcggtg atgtacctaa 240
 aagtcggtag ccatggctta gcaatagcgt cgacaccgga cgctgctaaa gcgttcctca 300
 aaaccctcga tttaaatttc tcgaaccggc caccaaatgc cggagctacc catttagcct 360
 ataacgctca agatatggtt tttgacatt atggtcctaa atggaaattg ttacgtaaac 420
 tcagtaactt acacatgcta ggtggcaaag ccttggaaaa ttgggctgat gttagaaaaa 480
 cagagcttgg ttatatgctt aaagccatgt ttgaatcgag tcaaaacaat gagccggtga 540
 tgatttcgga gatgctaacg tacgccatgg cgaacatggt aagccaagtt atacttagcc 600
 gtcgctgatt caataaaaaa ggcgcgaaat caaacgagtt taaagatatg gtggtcgaat 660
 taatgacgag tgccgggtat ttcaatatag gtgattttat accatcaatt ggttggatgg 720
 atttgcaagg gattgaaggt ggaatgaaaa gattgcacaa aaagtctgac gttttgttga 780
 ctcgattatt ggatgatcat aaaagaacga gtcaggagcg taaacaaaag cccgattttc 840
 ttgattttgt gattgcaaat ggcgataatt ctgatggtga aaggctcaac accgacaaca 900
 tcaaggctct tttattgaac ttgtttactg ctggtacgga tacatcatca agcatcattg 960
 agtgggcact agcagaactg ctaaagaatc ggacactcct caccgagcc caggacgaaa 1020
 tggatcgggt aatcgggcga gaccgccgct ttcttgaatc agacatcccc aacttaccat 1080
 atcttcaagc aatctgcaaa gaaacattcc gtaaaccacc ttcaacacca ttaaaccttc 1140
 caaggaattg catcagaggc catgtggatg taaatgggta ctacattccg aaagggactc 1200
 ggctcaacgt caacatatgg gcgattggaa gagaccatc ggtttggggg gataaccgga 1260
 acgagttcga cccggagagg tttttgatg ggaggaatgc taagattgat ccacgaggaa 1320
 accattttga attgatccca tttggtgctg gacgaagaat ttgtgcagga acaagaatgg 1380
 ggatattgct tgttgagtat attttgggga cattggtgca tagttttgat tggaaactgg 1440
 gattttctga ggatgagctt aatatggatg agacatttgg gcttgctctg cagaaagctg 1500
 tgccttttagc ggccatgggtt attccacgcc ttctcttca tgtttatgct ccttaattca 1560
 gagatttaat ttcatgcttt gttttattaa tcattttctt aatatgaatt gatggaggtt 1620
 atctagtat gaaaaataat aatggaggat ttgtttatca tcatgcaaaa aaaaaaaaaa 1680

aaaa

<210> 23

<211> 516

10

ES 2 435 737 T3

<212> PRT

<213> genciana

<400> 23

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

ES 2 435 737 T3

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

ES 2 435 737 T3

Lys Ile Asp Pro Arg Gly Asn His Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala
 435 440 445

Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Thr Arg Met Gly Ile Leu Leu Val Glu
 450 455 460

Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His Ser Phe Asp Trp Lys Leu Gly Phe
 465 470 475 480

Ser Glu Asp Glu Leu Asn Met Asp Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Gln
 485 490 495

Lys Ala Val Pro Leu Ala Ala Met Val Ile Pro Arg Leu Pro Leu His
 500 505 510

Val Tyr Ala Pro
 515

<210> 24

<211> 3731

<212> ADN

5 <213> petunia

<400> 24

tctagatatg cattttggtc gacgaactca caaatttgta ccaaacatgt aatttttttt	60
ttctttttta cccttttaa cattacaatt gaataagtag tacaacaaca taccagttt	120
tattttacag gtgggacctg gggaggggta aatgtacgca cacctacca ccaccaaggt	180
ggagaggcag tttccggtag agcctcggct gaagaaaata tttcgagaac acgtttgaaa	240
aataggacag aaagaacaca ctataaata ataaaactaa agcatataca tattaaacat	300
atagtagcag taggtataaa ggcactgact acgacagaaa taatctatat ataggagaga	360
agacactcat ccattatcta cccttctact ttaatcattg acctccaagc ttcctatct	420
agggatcatg cctcgggat ctagatctgg gccatgtctt atctaatacac ctcgggtccag	480
ttcttcttag gtctacctct acctctccgt agacctaaaca ctgcgaacct ctcacacctc	540
ctaaccgagc atctggactt ctctcttta cgtatctgaa ccatctcaat cttgtctctc	600
gcatcttttc tgccactgga gatacgtcca ccttgtctca agtgatectca ttcataatct	660
tgccctctct agtattccca aacatccatc tgagcattct taattctgcc acaccaaacc	720
ttctaaatgt gtgagttctt gactggcaaa cactcagccc catacaatat agctgggata	780
acgaccatgt ataataat gaagctaatt aaaatcatta attactactt gtacatatgg	840
cacggaaaag aagttcattg aacaataatg gatataaaaa ttgcgggtcaa cacattgggtg	900
agggaaatat ttttatcagc acaccaacat ttccaaacat caataaagca atgaagatgg	960

ES 2 435 737 T3

atagatcaag gtgtcctttt tcatcttatt aggaaaataa aatttgaaga tgcaaatcca 1020
 aggacgatca tgcattctaa attaatagtt aatgattcta attttcattt atttaaattt 1080
 tgatttttgc ggcttcaaat tcataattga ttttcaacca cataaatatt taattatgac 1140
 ttgtgttagg caacaaatac caaaagtctt actactttct tttggagatt gacctttcta 1200
 tatctccttc ccaatttgat cgatcgagct ctcgtaatct attgctactg tgtctttttt 1260
 gttctggcta gcgaagacag aatattctac gtaaactcta tgtcaagtca aaccgtgcca 1320
 cataaaataa aatgtagga atatagatca attagtgtct aagtgtacaa ctatatatat 1380
 gttatctaag aatagattag attacaaaaa tgtatttacc attgattgat cactactttt 1440
 cagcgaatta gtcaagaggt cagggttatt tataaaacat gcataatgta tacatatcat 1500
 gccgtggcca ttgtacaatt atgttataaa aggtatacat taaatataac ttgtatttat 1560
 tttttataca tgtcagcaat gtttgaaagt gtgaagttcc ctggttctta taattcaatc 1620
 ttctgataat gtttttaacc ggccagaaca cagcattaac tccattaatc ataccaatta 1680
 tgaccatgga atcagattct agtaacaaca taccgggcta tattctacaa gtggggcctg 1740
 aggagggtaa ggtatacgta aaccatacac ttaaggtaga gaaattattt ctgaaagatc 1800
 ctagactcac acgtttcgaa aaataggttt aaaaaaact tacataaaaa aaaaataata 1860
 aaataaagat acagataaag ataacagag taaacaaaac aacaatggta atatacagac 1920
 aaaaagcaag ataaaaatag tatatggaag aaaaatacaa atgcttatat gacagaagtc 1980
 gctcgactac cttcaaacgt tctactctaa tccttgacct ccatacactc ctatctaagg 2040
 ttatgtcctc gattatccga aagattgaat cttgaatcaa attctatata tacaagaatt 2100
 atttaactcc tgtattacaa gttcttatat ttcacgaac aaccactttt ggttcatcaa 2160
 gaatagtgca atatagataa aattatctct aaatactttg gacgagggat taccatttaa 2220
 atgtaataag aaaaatgtcg atggatttgg aagtgcacaac aaagtccac atcggtagtt 2280
 gaaaagtttg gaatccaacg tataaggtgt atgtatctct taatggtgta agacatttta 2340
 tgaaaactgt gttggcttag caaaagcga acaatatcac tccatttcaa gaatatcttg 2400
 gttgttttag tccagcaact ggtatcagag caaatggttt agcaaaatga gtatgttgty 2460
 tagtgattgc gtggggcatg acttagcctt tacccttgac ttggagaggg cccggttaat 2520
 gtctttgctc atctacagcc agtttattac ctttccatgt agctttaaag acgcacacag 2580
 aggtattcgg ttgatgtggg tgacacacaa taaatctcca aataaaccca atagtgggta 2640
 ttggtcatgt gaaacttagt tcgaggggga gattgttgag agtgtgaaca aaaagtccta 2700
 catatagatg aaaagttag gagcctattt ataaggtata tggatctctt aataatgtgg 2760
 gggtttatag gaatttagat tttacttata tcgtttataa attgattaga tacgggacca 2820
 tccagcttc taaaatgtag gcacgttcca tgcttcaatg ttccatctga tttgtaggct 2880
 ataaaggtag aatacgttta agaaagttta taatttacgt aataatccaa aagtgaaatg 2940
 tgtttattta ttggttatac tctaattggg gtttatgtga tctaattttc gtccggatca 3000

ES 2 435 737 T3

	gtctccaaag attagccaca aatacatatg tgttcataaa atgttacact tgggaactaa	3060
	ctttataggt agctcgatct attagtaatg gtaaaacttc accgtgttat ttgcagcaag	3120
	ccaataaatg cacgatatat gattatacat aaatTTTTat catttgatca tcatggtaa	3180
	tacttcaacc gtcccaaaat agatggttag ttttacttt tttttatcaa aataaatgtt	3240
	aatttagaat atcaatgaaa ttactTTTT ttttaacca tattgtcctt gctattgaaa	3300
	aggtagaata tgataattta ttcttttaca tataacaatg aaataaataa gaataattag	3360
	gtaaaatata tgatagtag atacatgttt ttctcaatgg gcataaaaat gtgaaattca	3420
	attataacgg gataaggggt atatttctca gctcactcta atacaatttg gtgaaatac	3480
	cgaatgcgag tatttaacct gagtttgga attatgtacc atcagaaatc gcatcgaaatg	3540
	taactcaaaa atagtacaaa caaatccct cactgctcca ttggcatta atttaggtcc	3600
	aatttctact ctataaaagc ccataggatc tctctagctt ttgtactcaa cactcaggca	3660
	aaaccattag caatatcgtc cactacttcc tccgactatt ctctccattg tattatcttt	3720
	cctcttaaac a	3731
	<210> 25	
	<211> 31	
	<212> ADN	
5	<213> clitoria	
	<400> 25	
	gggatccaac aatgttcctt ctaagagaaa t 31	
	<210> 26	
	<211> 1831	
10	<212> ADN	
	<213> kennedia	
	<400> 26	
	cccctgaata tcctcactaa agggaacaaa agctggagct ccaccgCGgt ggcggccgct	60
	ctagaactag tggatcccc gggctgcagg aattttttaa atattaaaga ttttgataaa	120
	atttaaaatc ttagtacggc atggccaact tagatcactt gttccttctc aaagaaattg	180
	ctatgtccat tttgatcttc ttgatcactc acctacccat tcattcactc ttcacaaacc	240
	gtcacaaaaa gcttccacca gggcctagag gctggccaat cgtaggtgcc ctccctgtct	300
	tgggaagcat gcctcatgtc acctctctca gaatggccaa aaagtatgga cccgtcatgt	360
	acctcaagat gggcaccaaaa aacatggttg tggcctctac tcccgctgca gctcgtgcat	420
	tcctcaaaac cttgatcaa aacttctcca accgcctcc aaatgctggt gcaactcact	480

ES 2 435 737 T3

tagcttatga ttcacaggac atggtgtttg cccactatgg ctctaggtgg aggttgctta 540
 ggaaactgag caacttgac atgctgggtg gaaaggctct tgatgattgg gcacatgttc 600
 gggagaaaaga gatgaggtac atgcttggtt caatgtatga ttgtagcaaa aggggtgagg 660
 ctgtggtggt ggctgagatg ttgacatatg ctatggccaa tatgattggt caagtgatat 720
 tgagccgtcg tgtgttcgag tcaaagggtt cggaatcaaa cgagttcaag gacatggttg 780
 ttgagctcat gaccgttgcc gggacttca acattggaga ttttgtgcct tttcttgcgt 840
 ggtttgactt gcaaggcata gacgtgaga tgaaggcctt gcataagaag tttgatgcgt 900
 tgttgacaag gatgattgag gagcatgtgg cttctagatg tcacaaaggt aaaggaaact 960
 atgatttcct agacgttgct atggatcatt cttagcгааag cagtgatgga gagagactca 1020
 cactaccaaa tgtcaaggca ctgctcttga atcttttcac agcaggcact gatacatctt 1080
 cgagtgtgat agagtgggca ctagcggaga tgttgaaaaa tccccacata acaaagagag 1140
 ctcatgagga aatggaccaa gtcataggca aggatcgacg cctcaaggaa tctgacctaa 1200
 ggaaccttcc ttacttgcaa gctatttgca aagaggcatt gagaaagcac cttcaacctt 1260
 cattgaactt gcctagagtc tcatcacaac cgtgccaaagt gaatggctat tacatcccca 1320
 agaacactag gctgagtgtg aacatatggg ccattggaag agaccccagag gtgtgggaga 1380
 acccttgtga gttcaatcct gagaggttta tgagtggaaa aggtgccaaa gttgatccac 1440
 atgggaatga ttttgagctg attccgtttg gtgctgggag aagggtgtgt gctgggacaa 1500
 ggatggggat tgtgatggtt cagtacatat tgggcacttt ggtgcactca tttgaatgga 1560
 agctaccaaаа tggggtggtg gagttgaaca tggaagagac ctttgggctt gccttgcaga 1620
 aaaagggtgcc actctcggtt ttggttagcc ctaggttgca cccaagttct tatattcagt 1680
 agagttgggt ttggtttggt tcaccaactc tgttcaaaca ttatgtctag ctatttaaaa 1740
 attacaatac atgctttaag gttatgtgac tatatattgc gcaaaccgcg caaataataa 1800
 atgtgctttg gatcaaaaaa aaaaaaaaaa a 1831

<210> 27

<211> 513

<212> PRT

5 <213> kennedia

<400> 27

Met Ala Asn Leu Asp His Leu Phe Leu Leu Lys Glu Ile Ala Met Ser
 1 5 10 15

Ile Leu Ile Phe Leu Ile Thr His Leu Thr Ile His Ser Leu Phe Thr
 20 25 30

ES 2 435 737 T3

Asn Arg His Lys Lys Leu Pro Pro Gly Pro Arg Gly Trp Pro Ile Val
 35 40 45
 Gly Ala Leu Pro Val Leu Gly Ser Met Pro His Val Thr Leu Ser Arg
 50 55 60
 Met Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Val Met Tyr Leu Lys Met Gly Thr Lys
 65 70 75 80
 Asn Met Val Val Ala Ser Thr Pro Ala Ala Ala Arg Ala Phe Leu Lys
 85 90 95
 Thr Leu Asp Gln Asn Phe Ser Asn Arg Pro Pro Asn Ala Gly Ala Thr
 100 105 110
 His Leu Ala Tyr Asp Ser Gln Asp Met Val Phe Ala His Tyr Gly Ser
 115 120 125
 Arg Trp Arg Leu Leu Arg Lys Leu Ser Asn Leu His Met Leu Gly Gly
 130 135 140
 Lys Ala Leu Asp Asp Trp Ala His Val Arg Glu Lys Glu Met Arg Tyr
 145 150 155 160
 Met Leu Gly Ser Met Tyr Asp Cys Ser Lys Arg Gly Glu Ala Val Val
 165 170 175
 Val Ala Glu Met Leu Thr Tyr Ala Met Ala Asn Met Ile Gly Gln Val
 180 185 190
 Ile Leu Ser Arg Arg Val Phe Glu Ser Lys Gly Ser Glu Ser Asn Glu
 195 200 205
 Phe Lys Asp Met Val Val Glu Leu Met Thr Val Ala Gly Tyr Phe Asn
 210 215 220
 Ile Gly Asp Phe Val Pro Phe Leu Ala Trp Phe Asp Leu Gln Gly Ile
 225 230 235 240
 Glu Arg Glu Met Lys Ala Leu His Lys Lys Phe Asp Ala Leu Leu Thr
 245 250 255
 Arg Met Ile Glu Glu His Val Ala Ser Arg Cys His Lys Gly Lys Gly
 260 265 270
 Asn Tyr Asp Phe Leu Asp Val Val Met Asp His Ser Ser Glu Ser Ser
 275 280 285
 Asp Gly Glu Arg Leu Thr Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu Leu Leu Asn
 290 295 300

ES 2 435 737 T3

Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ser Val Ile Glu Trp Ala
 305 310 315 320

Leu Ala Glu Met Leu Lys Asn Pro His Ile Thr Lys Arg Ala His Glu
 325 330 335

Glu Met Asp Gln Val Ile Gly Lys Asp Arg Arg Leu Lys Glu Ser Asp
 340 345 350

Leu Arg Asn Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Ile Cys Lys Glu Ala Leu Arg
 355 360 365

Lys His Pro Ser Thr Pro Leu Asn Leu Pro Arg Val Ser Ser Gln Pro
 370 375 380

Cys Gln Val Asn Gly Tyr Tyr Ile Pro Lys Asn Thr Arg Leu Ser Val
 385 390 395 400

Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Glu Val Trp Glu Asn Pro Cys
 405 410 415

Glu Phe Asn Pro Glu Arg Phe Met Ser Gly Lys Gly Ala Lys Val Asp
 420 425 430

Pro His Gly Asn Asp Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg
 435 440 445

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

Gly Thr Leu Val His Ser Phe Glu Trp Lys Leu Pro Asn Gly Val Val
 465 470 475 480

Glu Leu Asn Met Glu Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Lys Val
 485 490 495

Pro Leu Ser Ala Leu Val Ser Pro Arg Leu His Pro Ser Ser Tyr Ile
 500 505 510

Gln

<210> 28

<211> 1374

<212> ADN

5 <213> crisantemo

<400> 28

gaattccggtt gctgtcgcta cttacaaaga tcatatacat tttcgttcac cgatattaa

60

ES 2 435 737 T3

caccgatggc ttccttaact gacattgCGG ccattagaga ggctcaacgg gctcaaggtc 120
cagctaccat tctagcgatc ggcaactgcaa ctccggctaa ttgtgtatat caagctgatt 180
atcccgatta ctattttcgg atcactaaaa gtgaacacat ggtggatctt aaagagaaat 240
tcaagcgcat gtgcgacaag tctatgataa gaaaacgata catgcacctc acggaggagt 300
atcttaaaga gaacccaaac ctttgtgagt acatggctcc gtccctcgat gctcgccagg 360
atgtggtggt cgttgaggtc ccaaagcttg gaaaagaagc cgcaacaaaa gctattaaag 420
aatggggaca accaaaatct aaaatcaccc acctaatctt ctgcaccaca tctggtgtag 480
atatgcccgg ggctgattac caactcacca aactcctcgg cctccgccct tcgggtcaaac 540
gttttatgat gtaccaacaa ggggtgctttg cagggtgggac ggttcttcgt ctagcaaaag 600
acctcgcaga aaacaacaag gatgcacgtg tcctagttgt ttgttccgag attactgcag 660
tcacattccg tggcctaac gacactcatc ttgattcact cgttgggtcaa gctttgtttg 720
gggatggagc tgcggctgtc attgttggtt cagaccctga cttgacaaaa gagcgtccat 780
tgttcgagat gatatctgct gctcaaaacta tcttaccaga ctcggaggga gcaatcgatg 840
ggcacttgag ggaagtcggg ctaacatttc atctcctcaa agacgtacct gggttgatct 900
ccaagaacat agagaaggca ttgacacaag ctttttctcc attaggtata agtgactgga 960
actcgatctt ttggatcgct catcctgggt gtccagctat tctggacca gttgagctta 1020
agctcggtct caaggaggag aagatgagag ccactagaca cgttcttagt gagtatgga 1080
acatgtcaag tgcttgtgtt ttgttcatta tggatgaaat gaggaagaaa tcggctgagg 1140
aagggtcagc cacaaccggt gaagggctag attgggggtg tttattcggg ttcggtcctg 1200
gtttgacggt cgaaacctg gtccctccaca gcctcccaac cactgtatcg gttgcaaatt 1260
aatntagttg catggttatg gatataagcg tcttttgttg gaacaattaa atttttactg 1320
ttttgtttt ctactaaata aatgtgtgtt tgcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1374

<210> 29

<211> 398

<212> PRT

5 <213> crisantemo

<400> 29

Met Ala Ser Leu Thr Asp Ile Ala Ala Ile Arg Glu Ala Gln Arg Ala
1 5 10 15

Gln Gly Pro Ala Thr Ile Leu Ala Ile Gly Thr Ala Thr Pro Ala Asn
20 25 30

Cys Val Tyr Gln Ala Asp Tyr Pro Asp Tyr Tyr Phe Arg Ile Thr Lys
35 40 45

ES 2 435 737 T3

Ser Glu His Met Val Asp Leu Lys Glu Lys Phe Lys Arg Met Cys Asp
50 55 60

Lys Ser Met Ile Arg Lys Arg Tyr Met His Leu Thr Glu Glu Tyr Leu
65 70 75 80

Lys Glu Asn Pro Asn Leu Cys Glu Tyr Met Ala Pro Ser Leu Asp Ala
85 90 95

Arg Gln Asp Val Val Val Val Glu Val Pro Lys Leu Gly Lys Glu Ala
100 105 110

Ala Thr Lys Ala Ile Lys Glu Trp Gly Gln Pro Lys Ser Lys Ile Thr
115 120 125

His Leu Ile Phe Cys Thr Thr Ser Gly Val Asp Met Pro Gly Ala Asp
130 135 140

Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Gly Leu Arg Pro Ser Val Lys Arg Phe
145 150 155 160

Met Met Tyr Gln Gln Gly Cys Phe Ala Gly Gly Thr Val Leu Arg Leu
165 170 175

Ala Lys Asp Leu Ala Glu Asn Asn Lys Asp Ala Arg Val Leu Val Val
180 185 190

Cys Ser Glu Ile Thr Ala Val Thr Phe Arg Gly Pro Asn Asp Thr His
195 200 205

Leu Asp Ser Leu Val Gly Gln Ala Leu Phe Gly Asp Gly Ala Ala Ala
210 215 220

Val Ile Val Gly Ser Asp Pro Asp Leu Thr Lys Glu Arg Pro Leu Phe
225 230 235 240

Glu Met Ile Ser Ala Ala Gln Thr Ile Leu Pro Asp Ser Glu Gly Ala
245 250 255

Ile Asp Gly His Leu Arg Glu Val Gly Leu Thr Phe His Leu Leu Lys
260 265 270

Asp Val Pro Gly Leu Ile Ser Lys Asn Ile Glu Lys Ala Leu Thr Gln
275 280 285

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

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

ES 2 435 737 T3

Gly Leu Lys Glu Glu Lys Met Arg Ala Thr Arg His Val Leu Ser Glu
 325 330 335

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

Arg Lys Lys Ser Ala Glu Glu Gly Ala Ala Thr Thr Gly Glu Gly Leu
 355 360 365

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

Val Val Leu His Ser Leu Pro Thr Thr Val Ser Val Ala Asn
 385 390 395

<210> 30

<211> 2979

<212> ADN

5 <213> crisantemo

<220>

<221> misc_feature

<222> (2051)..(2051)

<223> n = cualquier nucleótido

10 <400> 30

ttttaacgcg	cattagcctc	actaaagga	caaaagctgg	agctccccgc	ggtggcggcc	60
gctctgaact	agtggatccc	ccgggctgca	ggaattcgat	tggatgactc	gaacagctat	120
ggccatgatt	acttagtacc	acatgtaact	gagacttgca	atggacaagt	acttattatc	180
ctacaaccta	acttctttgt	tgtgtttaag	tccaaaaagt	tatgctgctc	gccagaatcc	240
atcaaaatgt	gtagcatttg	tttcaacaca	tgccctttaa	cccgtatagt	gttatgagtt	300
ggtactccag	acaatacatt	aagagatata	ttgggtatgc	attgttgtgt	atcatctccc	360
acacatgctc	agttatgtca	gtatcacaat	cttcctcttc	caaacacaat	tctaattctc	420
cttccttctc	atctctaadc	tctaaagtaa	acatttgacc	ttcacactta	tgaccatgca	480
tatacttctt	atcacgataa	aaacatagat	tcttagccct	cttttcagca	tacttttttt	540
tacttaatta	ctttctaggt	gtaggcatgg	tgtttgcaaa	ctgtttggtt	accaactgag	600
ttgtaggcaa	agctaaaata	tttgaaatat	tttttagtag	gataagtcac	attcctgttt	660
acattccaat	tattattgta	cttaggagta	ggcaacaatg	agacactttt	tttcttaaca	720
actgctagcc	tagcttcttc	catcttagcc	caacaataga	catcatttaa	actagttggt	780

ES 2 435 737 T3

ttaaocatgc taaccagcat aactatctcg tctttcaatc caccaatata caaactaata 840
 gcatgagatt cactcaattc caccttattc aataaaactt caaaagaatc ttggatatacc 900
 tgaacagtgc tagtttgctt gacatttttc aattccacta taggatcttt aaagactgaa 960
 tcaaaccctt tcttgatag cctttcatac atatcccag taacaatttc cccatgtctt 1020
 tttcataaat tgcttgtttt agttaagggc tttgtcaaac acatgcatag agacaagcct 1080
 gatcctaattg aatgaagaac attaacaaaa tcaactaaaag aatcaagaac actaacataa 1140
 tcaactaattg acaagaataa ccaccacctt ttcaggtaca ccagaatata ataccactat 1200
 acaattccta aggctaagta gggttggatc agttggaaaa ccccttgctt ctcaaccgag 1260
 aggtcagggg ttcgatcctc actccctaca aaaggccgga ggtcctttat acctttggta 1320
 gagctggaag cagcctctct accttaggta ggggtaaggt tgtctacatc ttaacctccc 1380
 ccatacaccg gaaacggtat tgggtaccca taacctgtgg aagacggtat tgggagttac 1440
 ttttactttt ttttatacag ttccctaaggc taagcaaagt cgtgaccca cacgacctg 1500
 ccacatcagc tttatctctc caatgacctg atgacgacca agttgccaca gtcggtgacc 1560
 aagttaaaaa aaaagaaaaa aaagaaagaa ataagtgtgt gtgtgtgtaa aatcgatcga 1620
 agaatgacc gattgtgtgt ttacatgttg ctcaaccgat cctcgacctc gtctccaca 1680
 tgggtgctgac cgactttaaa gtcggtcctt cccctcgacc gaccgatctc tttcagcccg 1740
 ctgtgtctag cctaactaac gtgtgtaaga tttgaaaacg gaaatttaac caagaacgat 1800
 tttggataag acaaatgggt tagaatgatc agaatttatg tttgtatggt ggttgatcga 1860
 agatcaagaa ttgacagtgt accggaatat gtaacaagat aactgaatta taacataatg 1920
 gagttattag ttgtgatcaa atagcatgat gatgctctat taccattga aatgtactaa 1980
 atgtaatgac ttaaccataa tccataagat tgaaagttaa cataatcaaa cacaagaatt 2040
 actgaacaag nattgtaact cgaagtgaaa tgataattgg atttgattat gatcaatgtg 2100
 gtttgcaca aagacttaag agagagcaaa tcatccaaa actgattacc aatgaagaa 2160
 atgaaaatat ttaaagagaa ttacaaatgg cttgaaaatc ggttatgtgg tttgtttgaa 2220
 cttttgaagc tgcacgtga tataacacat aatatactt tatctttgtg atgcaccatg 2280
 tatgatacaa ctaataagtt gtatcaatat caatttctta aaaactggat atactttttc 2340
 ggtaacttat ttaagtccaa tgtattattt agtccctatg aaaagcgtct caatgatatt 2400
 tccccagtc aatgttaga ttttttattt tattttattt taaattcagc cataggcaaa 2460
 aatattagta agtcagctta tgcgtcccaa atataattgt tatacggctt aatgatttg 2520
 caattactac atttttatgt aatcatatct caatcaacag aattatgaga tgtggttgta 2580
 aaggccttct gaaaaattta atcaacagtt acctaattgg agattgatat gaaacaaaa 2640
 cttctggtgt atgcagctgg tcgatgacac tcaaatccgt aaccgaagtg ttaagaatt 2700
 atcgtattca cagtcatatc ttacggttaa aactttaaac gaaatcgaac taaactccta 2760
 acagatatcg aagctcaatt gtgtaattgt tttcaatgg ccacaacgtg gcatctatga 2820
 ccacgtctcg taaaacttgg gtacgtcata cctaccacac gttccctcta tataagaac 2880
 actcattcac ctaatgtcta ccatacttg cacttctcta cttacaaga tcatatacat 2940
 tttcgttcac cgatattaaa ccccatggc ttcctaac 2979

<210> 31
 <211> 1778
 <212> ADN
 <213> lavendula
 <400> 31

5

ES 2 435 737 T3

ctagtataaa tttttaata gtaggcatgc aaaatcaaga atctatcttc gtgatagcta 60
gagagctcac tatagcagcc tcaatctact ttctcatccg ctactttctt tcaagaatca 120
tcaccaccat taccacggc ggcagccacc gactgccgcc agggccgagg ggctttccga 180
ttgtcgggtgc acttctctc ttgggcgaca tgccacatgt cggcctagcc aaaatggcca 240
aaacttacgg ccccatcatc tacctaaaag tcggtgcatg gggcatggcc gtcgctcaa 300
cgctgcctc cgcccgtgcg tttctcaaaa ccctagacac caacttctct gaccgccctc 360
cgaatgcggg tgccaccata ttagcctaca acgcggaaga tatggtgttc gcccgctatg 420
gcccaaagtg gagattgctc agaaaactga ccaatctcca catggtgggg aatcatgctt 480
tagatgggtg ggcaagtgta aggtcctccg agttgggcta catgctccat gcaaggcacg 540
acgccaccgg tcatggcgag cccgtgggtg tgccagagat gctcatgtac gccgtgggga 600
atatgctcgg gcagtgata ttaagtagac ggattttcga gaagaaaggg aaggaggtga 660
atgagttgaa agatatggtg gtggagctca tgacttcagc tggatatttc aatattggtg 720
atctcatccc atggcttgct tggatggatt tgcaagggat agagagtggg atgaagaaat 780
tgcacaataa gttcgacaag ttgatcggca aaatgattga ggatcatttg aaatcagccc 840
acatacgcga ggccaagccg gatcttcttg attgcctctt ggcaaactgt gatagctccg 900
atgaggagaa gctcacctca accaacgtca aggccctttt actgaacttg ttcaccgcag 960
ggaccgacac gtcacaaagc ataatagaat gggcattggc cgagatgatc aagaatccaa 1020
ccatcctaaa tagggcccac caagagatgg atagagtcgt tggtagaact cgaaggttgg 1080
tcgaatcgga catcccgaac ctaccctacc tacgagccat atgtaaagaa acataticgca 1140
agcatccatc cactccccta aatctgcccc gaatcgcgct cgagccttgc gtcgtggagc 1200
gggtattacat acctaaaaac acccggctca gcgttaacat atgggctatc gggagagacc 1260
ccgacgtgtg gaaaaatcct cttgatttca accccgatag atttctatcg ggaagaacg 1320
agcggattga tccccgagg aaccacttcg agctcatccc gttcggggct gggcggagga 1380
tctgcgccgg gggccgatg gggatggtgc ttgtggagta tatttttaggc acgttgggtc 1440
acgctttcga atgggaactg ccggccgggg ccggggccgg cacggcggag ttgaacatgg 1500
accacgtgtt tgggctggcg ctgcagaaag ctgtgcctct cacggccatg ctcactccta 1560
ggctgccgct acattgttat gtccttaat ttctgttaca tttatagctc tcgtatttta 1620
tcttatcgaa ctagtttacc acccatgcat tttgcgttta tgttattata aattctatta 1680
cattattagt ctcgtatttt attttatcga actagtgtag cactcataca ttttgtgttt 1740
atatatacta taaagatcta ttacattaa aaaaaaaa 1778
<210> 32
<211> 520
5 <212> PRT
<213> lavendula
<400> 32

ES 2 435 737 T3

Met Gln Asn Gln Glu Ser Ile Phe Val Ile Ala Arg Glu Leu Thr Ile
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Ile Tyr Phe Leu Ile Arg Tyr Phe Leu Ser Arg Ile Ile
 20 25 30

Thr Thr Ile Thr His Gly Gly Ser His Arg Leu Pro Pro Gly Pro Arg
 35 40 45

Gly Phe Pro Ile Val Gly Ala Leu Pro Leu Leu Gly Asp Met Pro His
 50 55 60

Val Ala Leu Ala Lys Met Ala Lys Thr Tyr Gly Pro Ile Ile Tyr Leu
 65 70 75 80

Lys Val Gly Ala Trp Gly Met Ala Val Ala Ser Thr Pro Ala Ser Ala
 85 90 95

Arg Ala Phe Leu Lys Thr Leu Asp Thr Asn Phe Ser Asp Arg Pro Pro
 100 105 110

Asn Ala Gly Ala Thr Ile Leu Ala Tyr Asn Ala Glu Asp Met Val Phe
 115 120 125

Ala Arg Tyr Gly Pro Lys Trp Arg Leu Leu Arg Lys Leu Thr Asn Leu
 130 135 140

His Met Leu Gly Asn His Ala Leu Asp Gly Trp Ala Ser Val Arg Ser
 145 150 155 160

Ser Glu Leu Gly Tyr Met Leu His Ala Arg His Asp Ala Thr Arg His
 165 170 175

ES 2 435 737 T3

Gly Glu Pro Val Val Leu Pro Glu Met Leu Met Tyr Ala Val Gly Asn
180 185 190

Met Leu Gly Gln Val Ile Leu Ser Arg Arg Ile Phe Glu Lys Lys Gly
195 200 205

Lys Glu Val Asn Glu Leu Lys Asp Met Val Val Glu Leu Met Thr Ser
210 215 220

Ala Gly Tyr Phe Asn Ile Gly Asp Phe Ile Pro Trp Leu Ala Trp Met
225 230 235 240

Asp Leu Gln Gly Ile Glu Ser Gly Met Lys Lys Leu His Asn Lys Phe
245 250 255

Asp Lys Leu Ile Gly Lys Met Ile Glu Asp His Leu Lys Ser Ala His
260 265 270

Ile Arg Lys Ala Lys Pro Asp Leu Leu Asp Cys Leu Leu Ala Asn Arg
275 280 285

Asp Ser Ser Asp Ala Glu Lys Leu Thr Ser Thr Asn Val Lys Ala Leu
290 295 300

Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ser Ile Ile
305 310 315 320

Glu Trp Ala Leu Ala Glu Met Ile Lys Asn Pro Thr Ile Leu Asn Arg
325 330 335

Ala His Gln Glu Met Asp Arg Val Val Gly Arg Thr Arg Arg Leu Val
340 345 350

Glu Ser Asp Ile Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Arg Ala Ile Cys Lys Glu
355 360 365

Thr Tyr Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu Asn Leu Pro Arg Ile Ala
370 375 380

Ser Glu Pro Cys Val Val Asp Gly Tyr Tyr Ile Pro Lys Asn Thr Arg
385 390 395 400

Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asp Val Trp Glu
405 410 415

Asn Pro Leu Asp Phe Asn Pro Asp Arg Phe Leu Ser Gly Lys Asn Glu
420 425 430

Arg Ile Asp Pro Arg Gly Asn His Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala
435 440 445

ES 2 435 737 T3

Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Ala Arg Met Gly Met Val Leu Val Glu
450 455 460

Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His Ala Phe Glu Trp Glu Leu Pro Ala
465 470 475 480

Gly Ala Gly Ala Gly Thr Ala Glu Leu Asn Met Asp His Val Phe Gly
485 490 495

Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Thr Ala Met Leu Thr Pro Arg
500 505 510

Leu Pro Ser His Cys Tyr Ala Pro
515 520

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada para su uso como promotor que es operable en tejido de pétalo de rosa que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:30 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias con SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:30 o una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con al menos una de SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:30 o un complemento de las mismas bajo condiciones de alta rigurosidad.
2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucleico está seleccionada de SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:30.
3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 ó 2 operativamente ligada a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H), en la que la secuencia de nucleótidos está seleccionada de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:31 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias con SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:31 o una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con al menos una de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:31 o un complemento de las mismas bajo condiciones de alta rigurosidad, en la que la expresión de dicha molécula de ácido nucleico que codifica una F3'5'H en un tejido de pétalo produce niveles detectables de moléculas de delphinidina o basadas en delphinidina como se mide por una técnica cromatográfica.
4. Un método de producción de una planta transgénica que puede sintetizar una F3'5'H, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta con una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 3, en condiciones que permitan la eventual expresión de dicha secuencia de nucleótidos, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos.
5. Un método de producción de una planta transgénica con actividad de F3'5'H reducida, comprendiendo dicho método transformar establemente una célula de una planta con una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 3, regenerar una planta transgénica a partir de la célula y cultivar dicha planta transgénica durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos.
6. Una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o que comprende un nivel alterado de expresión de una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3 con respecto al nivel de expresión en una planta no genéticamente modificada, preferentemente en la que la planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma presentan flores alteradas o inflorescencia.
7. La planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma de la reivindicación 6, en la que la parte de planta está seleccionada del grupo que comprende sépalo, bráctea, pecíolo, pedúnculo, ovario, anteras, flores, frutos, frutos secos, raíces, tallos, hojas y semillas.
8. La planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma de la reivindicación 6 ó 7, en la que la planta está seleccionada del grupo que comprende rosa, clavel, lisianthus, petunia, lirio, pensamiento, gerbera, crisantemo, geranio, *Torenia*, *Begonia*, *Cyclamen*, *Nierembergia*, *Catharanthus*, *Pelargonium*, orquídea, uva, manzana, *Euphorbia* y *Fuchsia*, preferentemente rosa.
9. El uso de una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la fabricación de: (i) una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma; o (ii) una construcción genética que puede expresar F3'5'H o regular por disminución una enzima F3'5'H indígena en una planta.
10. Una molécula de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico aislada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene una función de expresión *de novo*, expresión en exceso, supresión de sentido, inhibición antisentido, actividad de ribozima, minizima y ADNzima, inducción de RNAi o inducción de metilación.
11. Un extracto de las flores de una planta genéticamente modificada o parte de la misma o células de la misma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
12. Un organismo procarionta o eucariota no humano que lleva una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 extracromosómicamente en forma de plásmido.
13. Uso de una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 3 en la identificación o amplificación y

clonación de material genético que codifica una F3'5'H.

14. Uso de una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1 ó 2 ó 3 en la identificación o amplificación y clonación de material genético que define un promotor de chalcona sintasa.

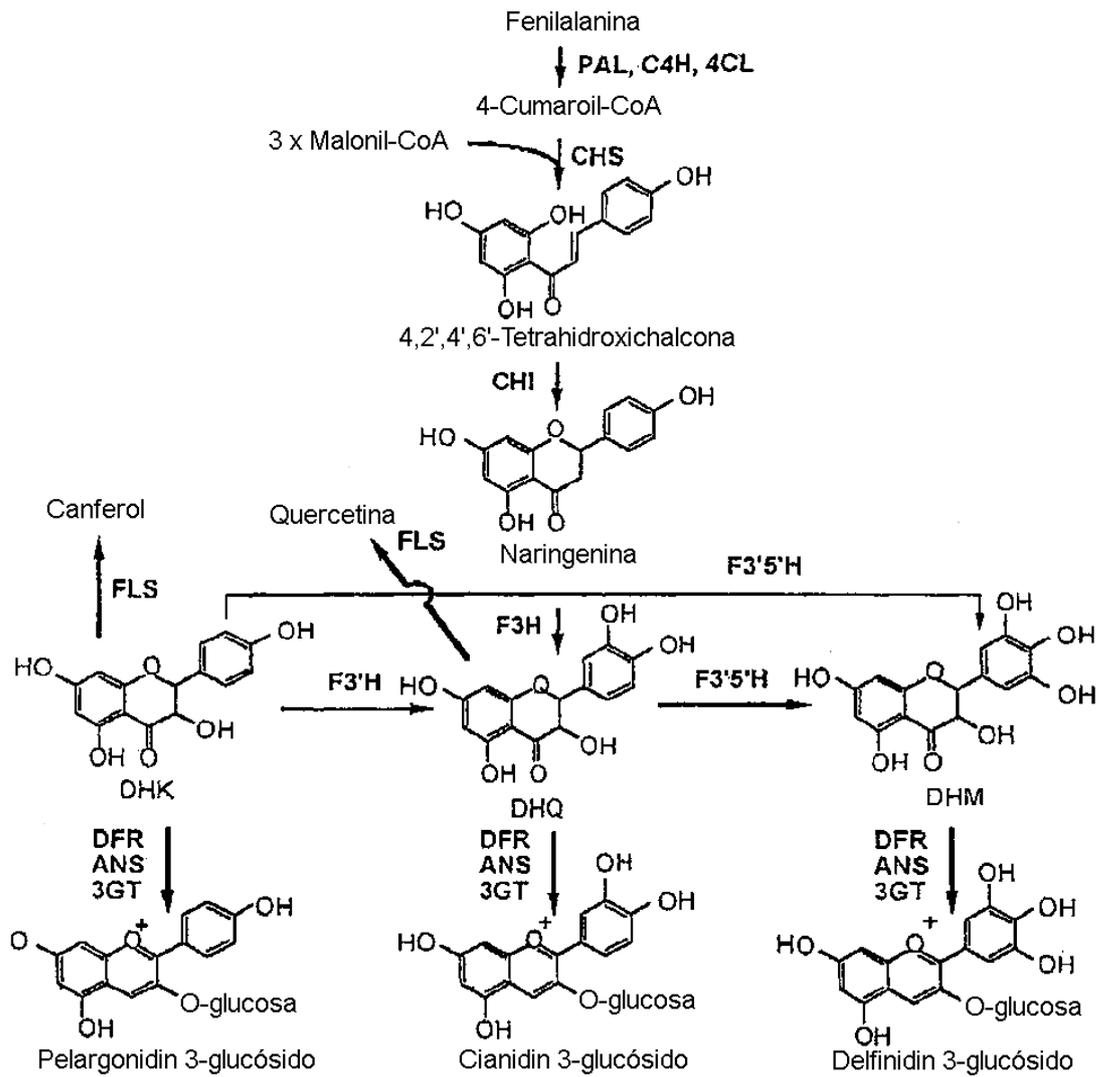


Figura 1a

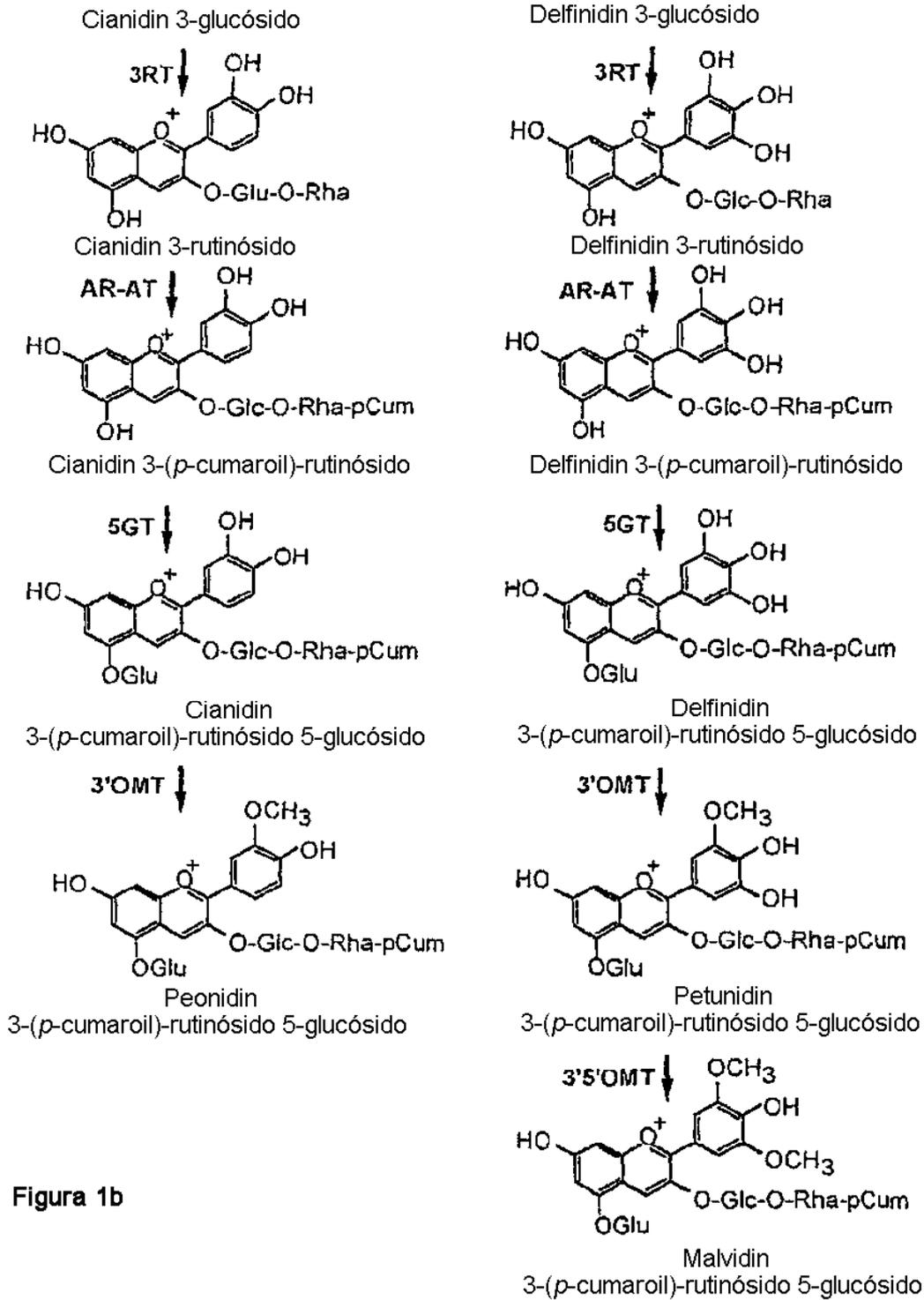
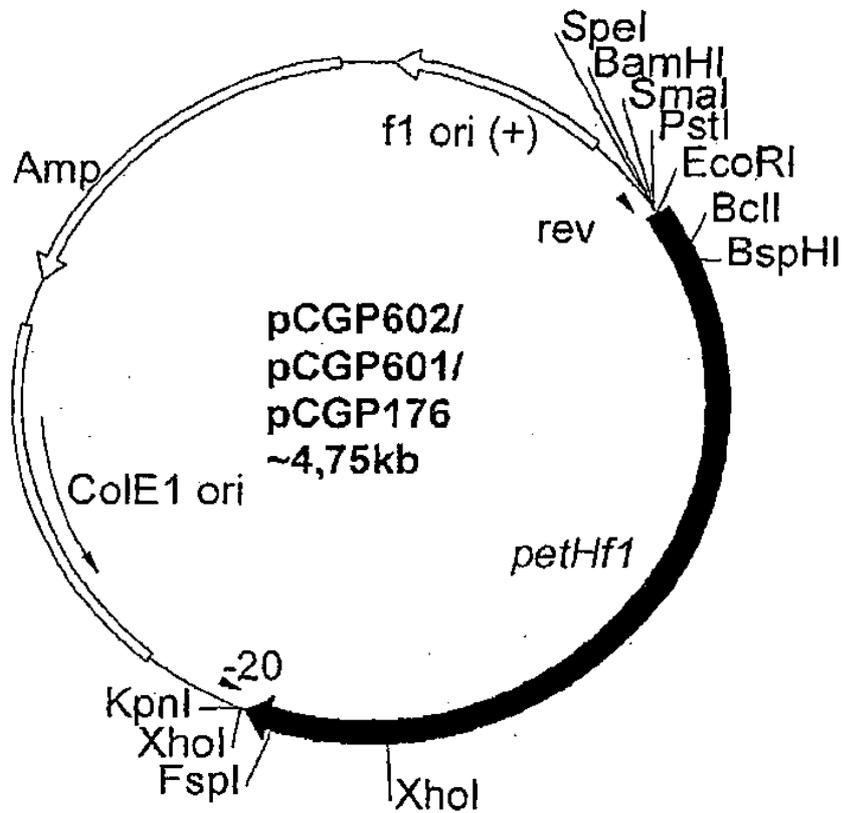


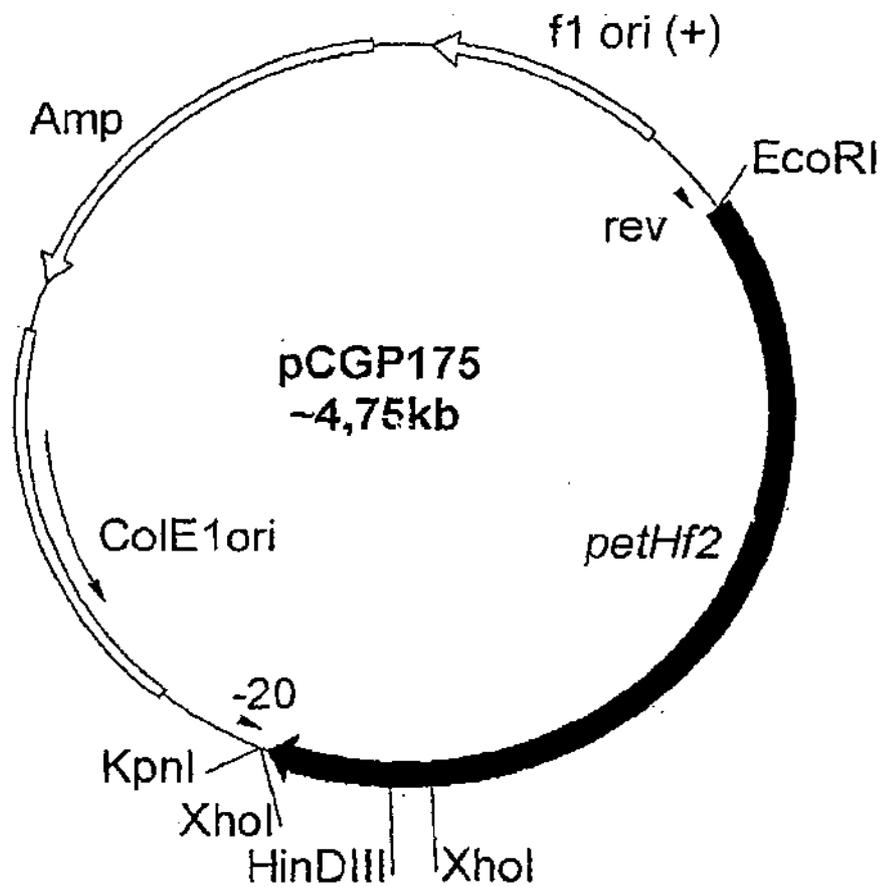
Figura 1b



Replicón: vector pBluescript SK (+) 2,95 kb

Inserto: homólogos de ADNc de F3'5'H *petHf1* de petunia de ~1,8 kb de *P. hybrida* cv. OGB

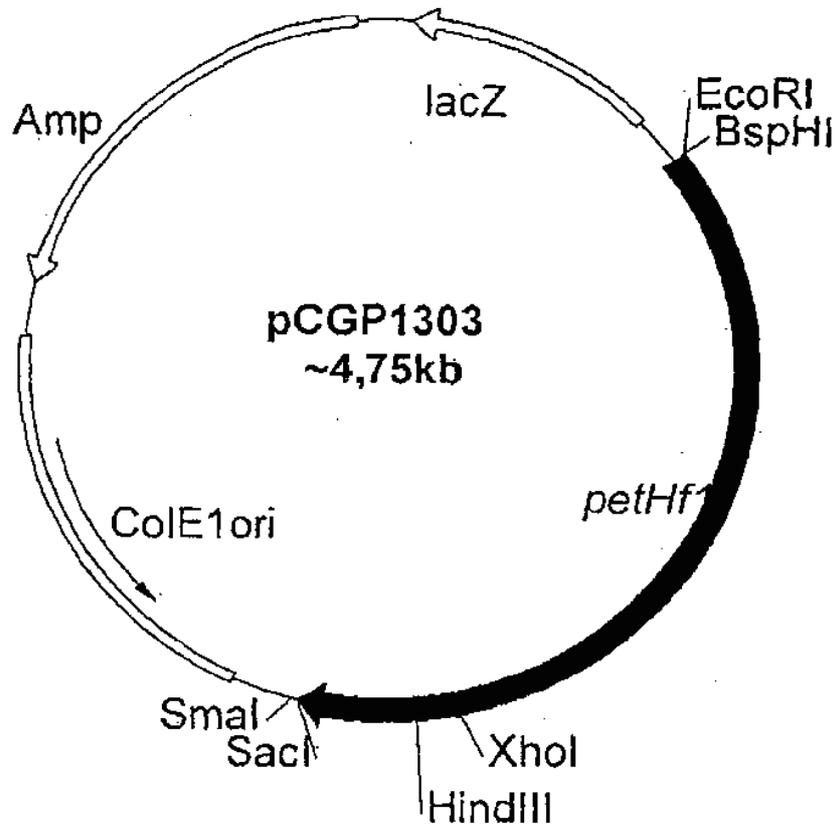
Figura 2



Replicón: vector pBluescript SK (+) 2,95 kb

Inserto: ADNc de F3'5'H *petHf2* de petunia de ~1,8 kb de *P. hybrida* cv. OGB

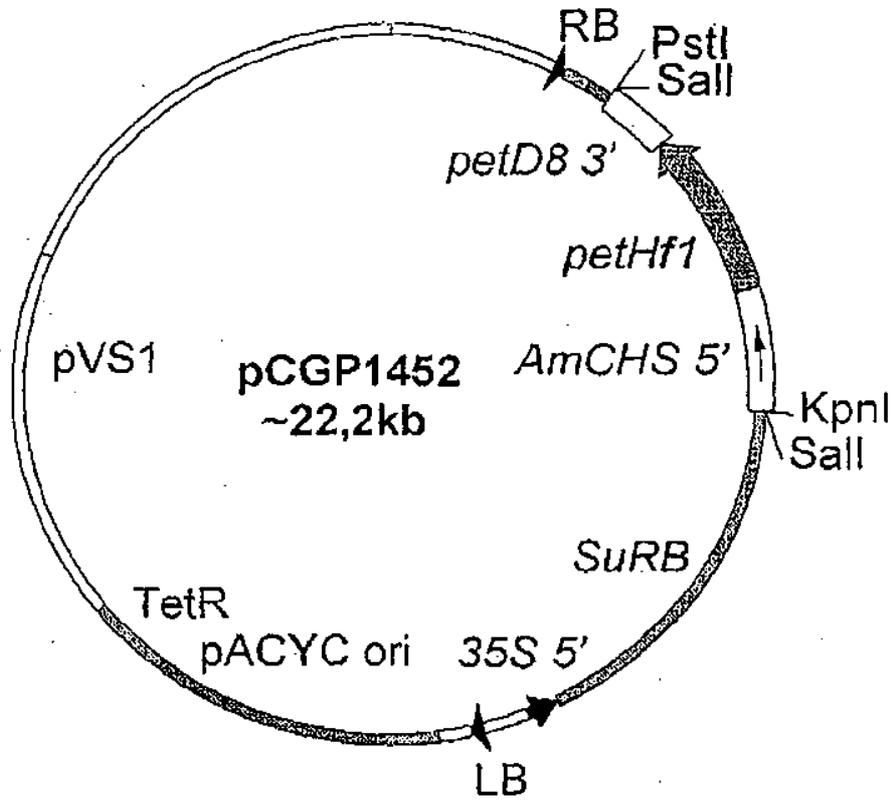
Figura 3



Replicón: vector pUC19 (romo) de EcoRI de ~2,7 kb

Inserto: fragmento BspHI (romo)/FspI de ~1,6 kb que contiene ADNc de F3'5'H *petHf1* de petunia de pCGP601

Figura 4



Replicón: vector pWTT2132 de SmaI de ~18,7 kb

Inserto: fragmento PstI (romo) de ~3,5 kb que contiene el gen *AmCHS* 5': *petHf1*: *petD8* 3' de pCGP485

Figura 5

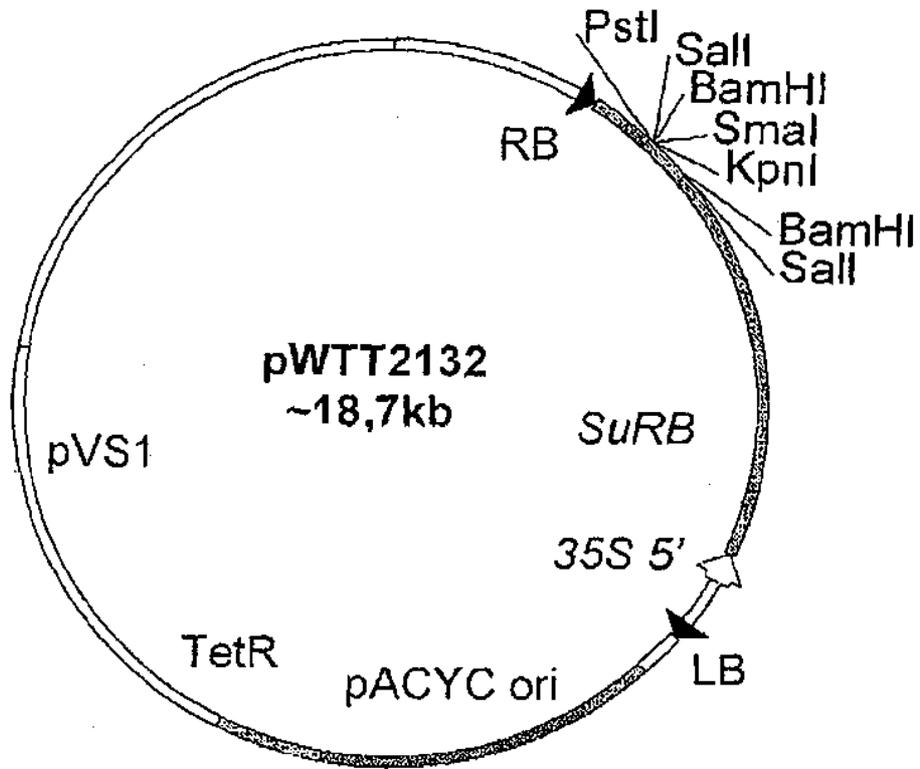
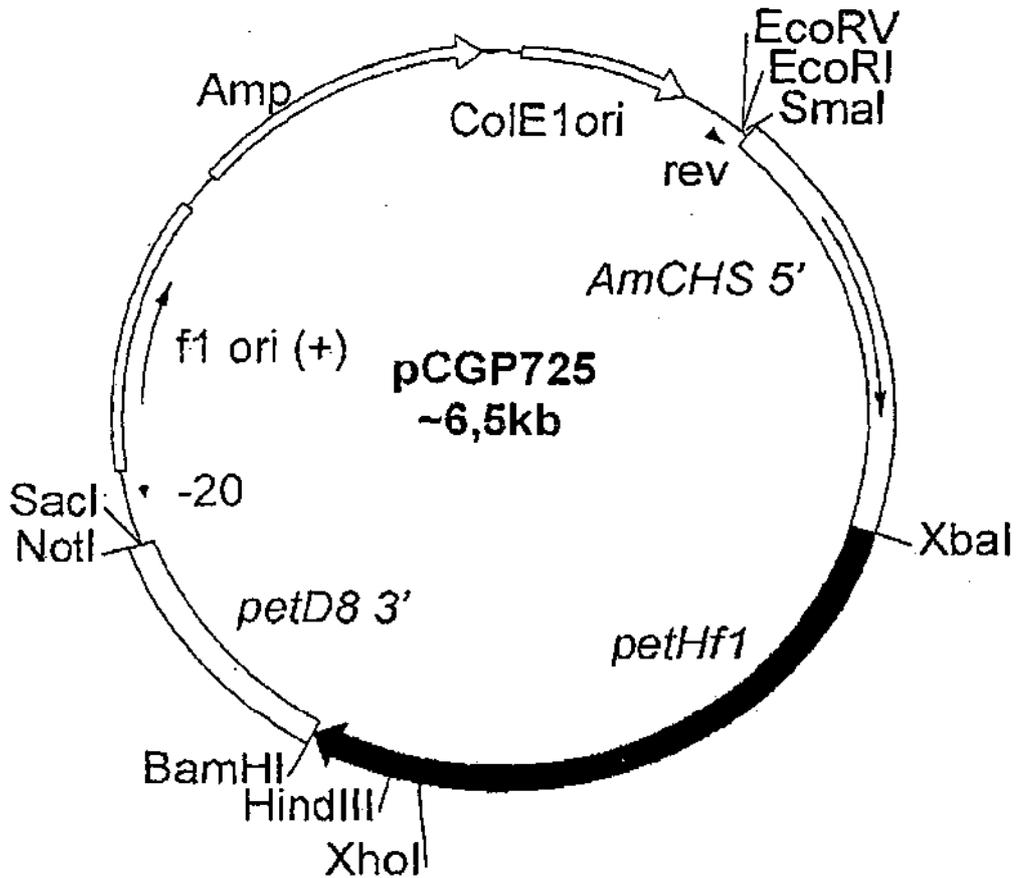


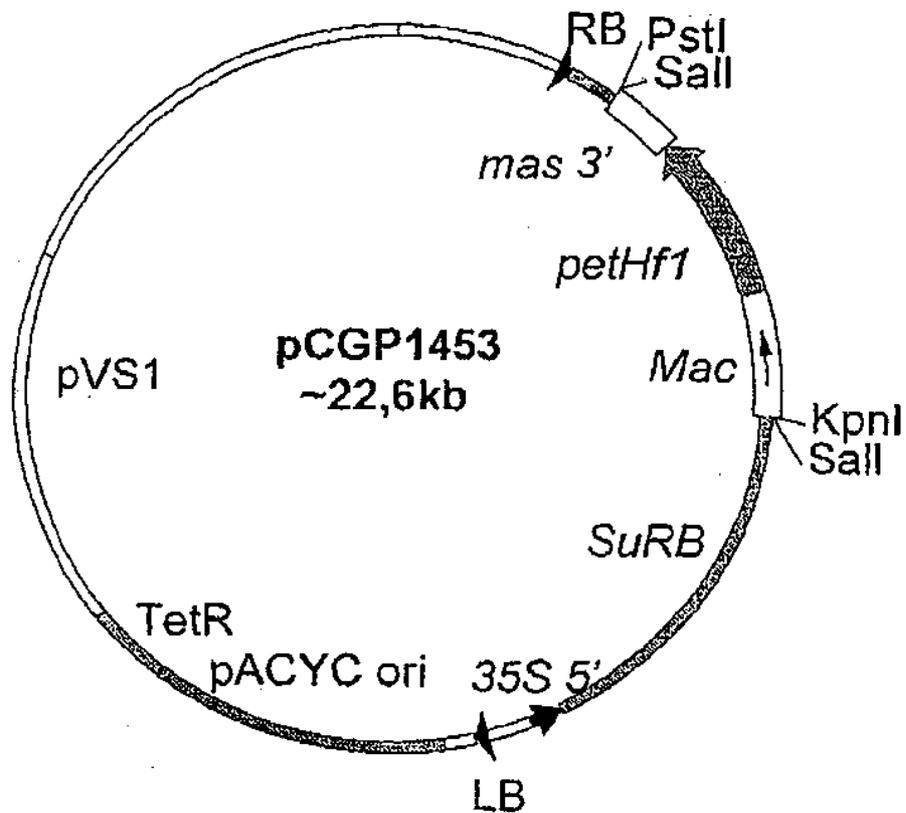
Figura 6



Replicón: fragmento de vector romo (BamHI/XbaI) de 2,95 kb de pBluescript II KS (+)

Inserto: fragmento (rombo) PstI de ~3,5 kb que contiene el gen *AmCHS 5'*: *petHf1*: *petD8 3'* de pCGP483

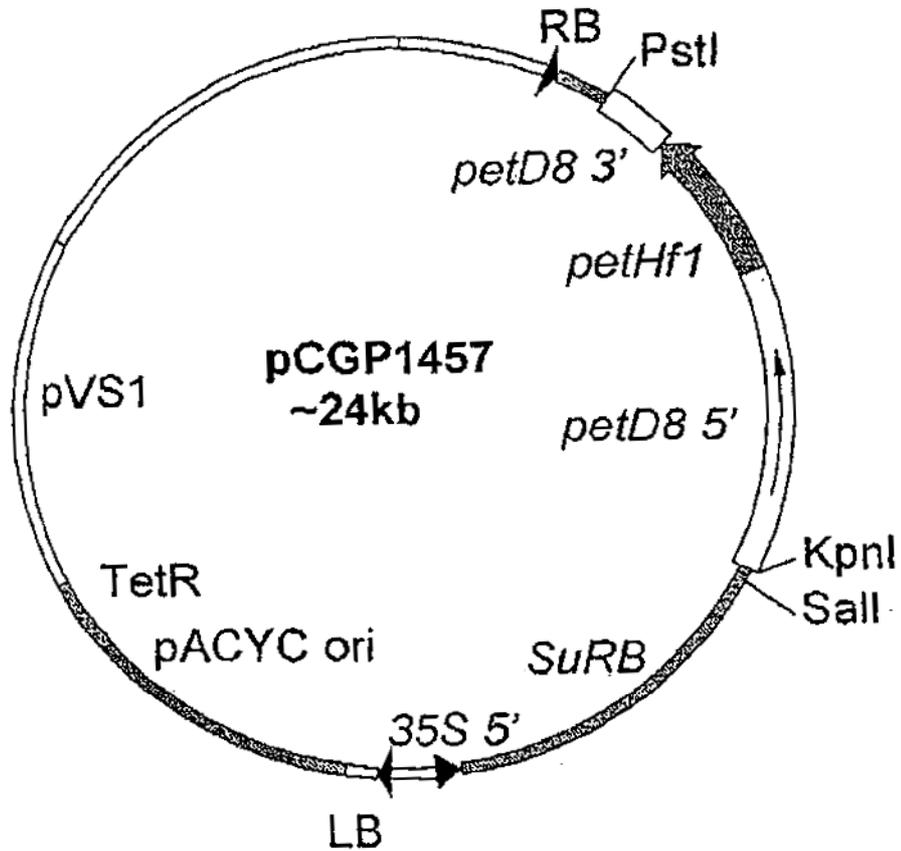
Figura 7



Replicón: vector pWTT2132 de SmaI de ~18,7 kb

Inserto: fragmento (romo) PstI de ~3,9 kb que contiene el gen *Mac*: *petHf1*: *mas 3'* de pCGP628

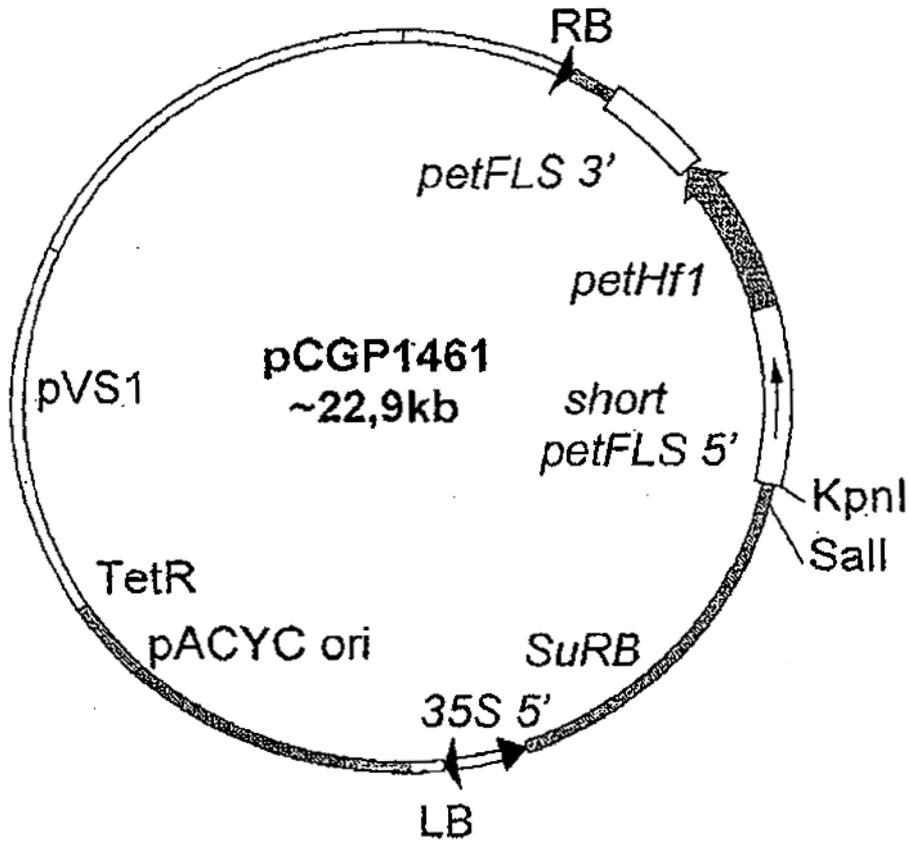
Figura 8



Replicón: vector pWTT2132 de SmaI/PstI de ~18,7 kb

Inserto: fragmento XbaI (romo)/PstI de ~5,3 kb que contiene el gen *petD8 5'*: *petHf1*: *petD8 3'* de pCGP1107

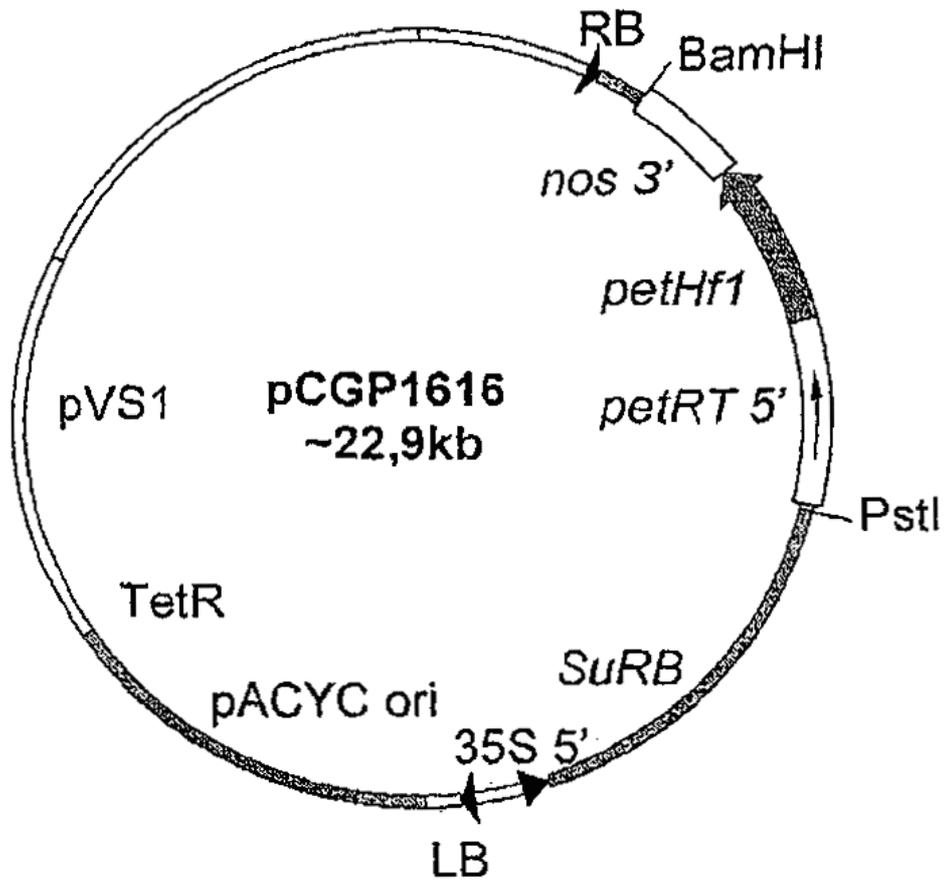
Figura 9



Replicón: vector pWTT2132 de PstI (romó)/KpnI de ~18,7 kb

Inserto: fragmento SacI (romó)/KpnI de ~4,35 kb que contiene el gen *shortFLS 5'*: *petHf1*: *petFLS 3'* de pCGP497

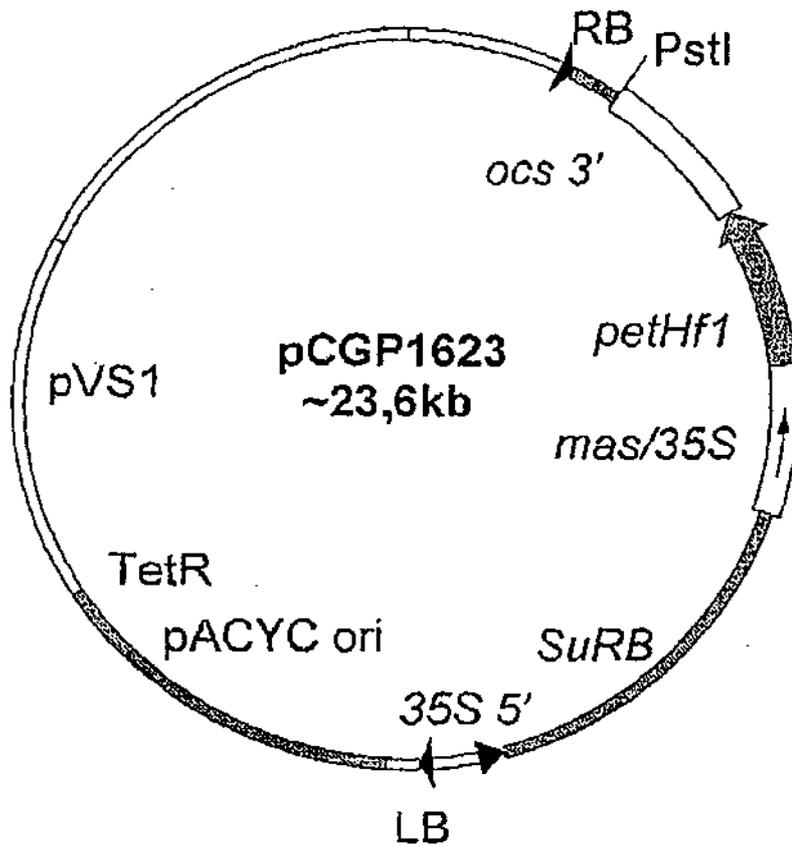
Figura 10



Replicón: vector pWTT2132 de PstI/BamHI de ~18,7 kb

Inserto: fragmento PstI/BamHI de ~3 kb que contiene el gen *petRT5'*: *petHf1*: *nos 3'* de pCGP846

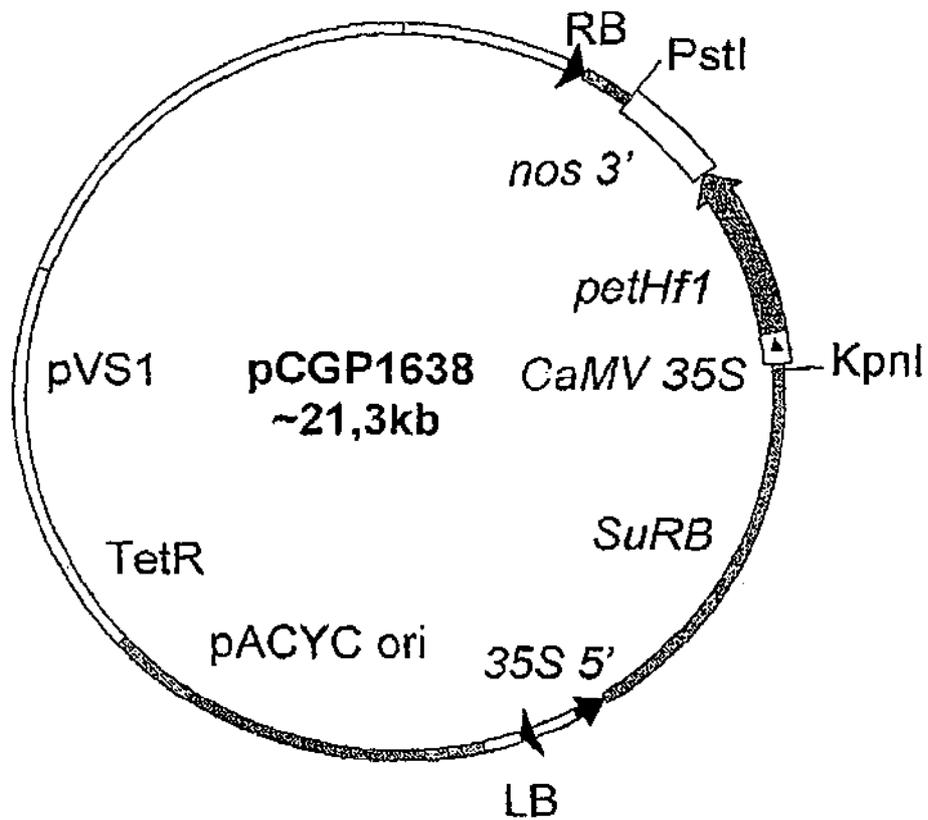
Figura 11



Replicón: vector pWTT2132 de Sall de ~18,7 kb

Inserto: fragmento XhoI de ~4,9 kb que contiene el gen *mas/35S*: *petHf1*: *ocs 3'* de pCGP1619

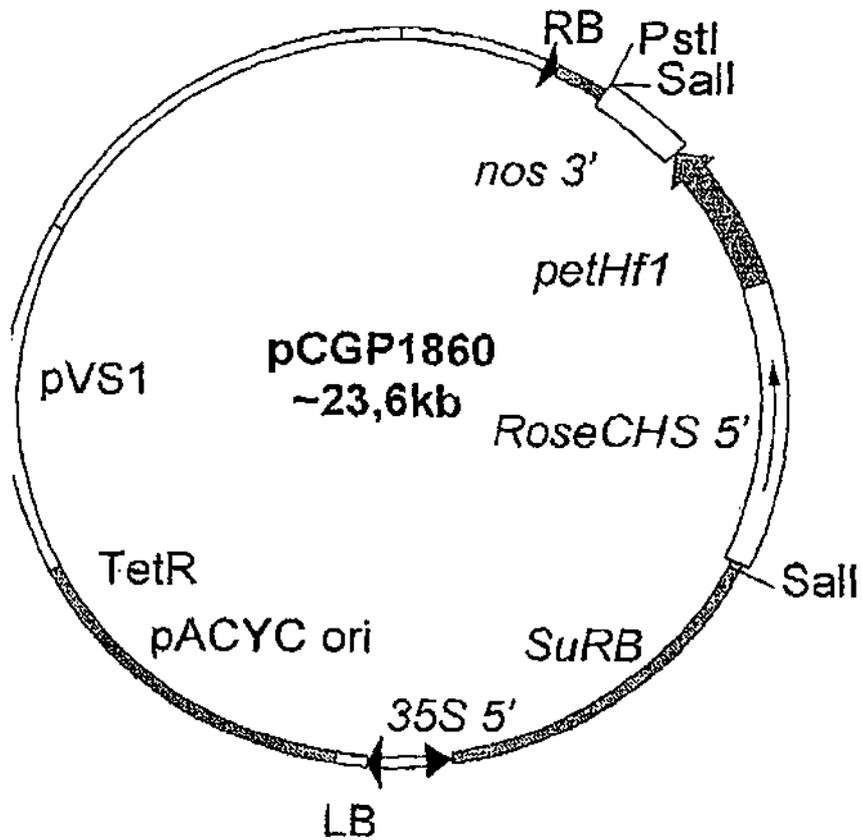
Figura 12



Replicón: vector pWTT2132 de *Sma*I de ~18,7 kb

Inserto: fragmento romo (*Pst*I/*Eco*RI) de ~2,6 kb que contiene el gen *CaMV 35S: petHf1: nos 3'* de pCGP1636

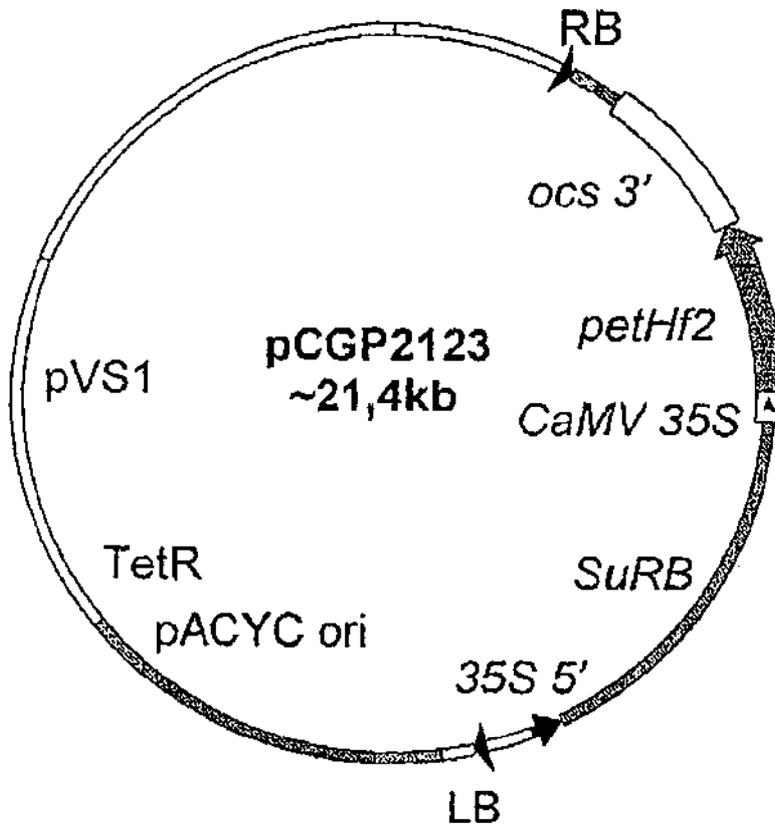
Figura 13



Replicón: vector pWTT2132 de BamHI de ~18,7 kb

Inserto: fragmento BglII de ~4,9 kb que contiene el gen *RoseCHS 5'*: *petHf1*: *nos 3'* de pCGP200

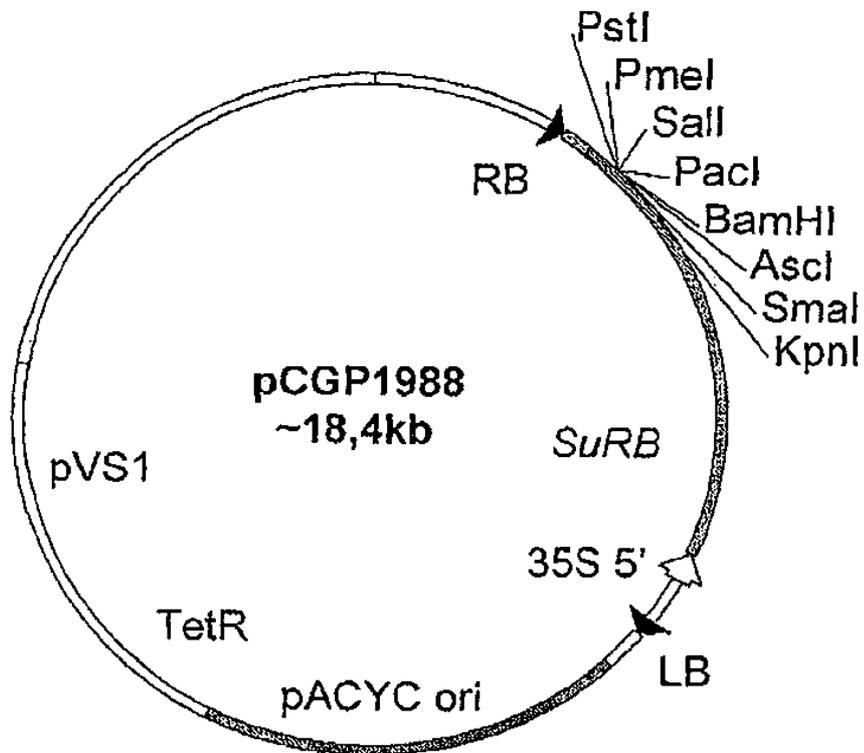
Figura 14



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: fragmento romo (Asp718/Xbal) de ~3,7 kb que contiene el gen
 CaMV 35S: *petHf2*: ocs 3' de pCGP2109

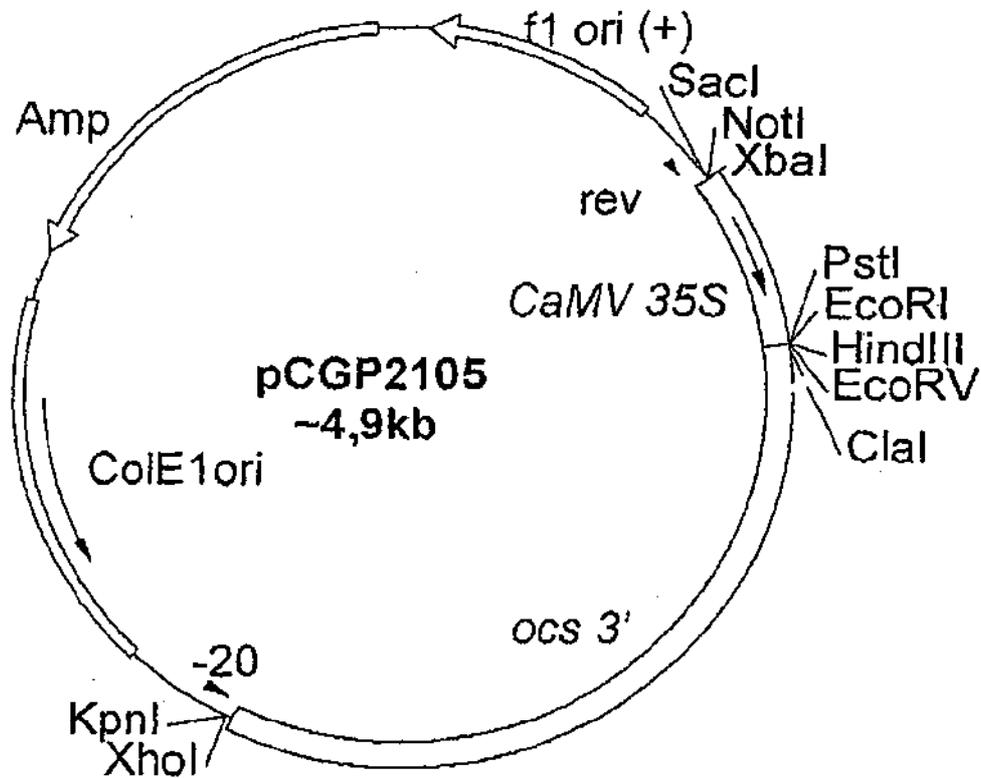
Figura 15



Replicón: fragmento de vector pWTT2132 de Sall (rombo)/PstI de ~18,4 kb

Inserto: fragmento EcoRI (rombo)/PstI de ~66 pb que contiene sitio de clonación múltiple de pNEB193

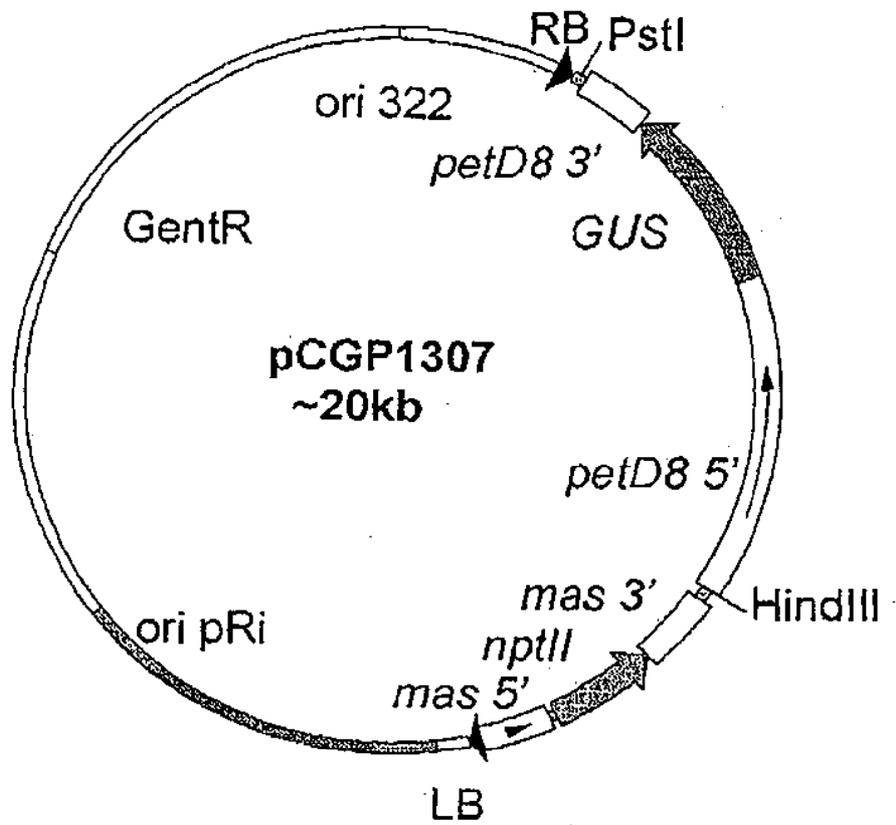
Figura 16



Replicón: fragmento de vector HincII/XhoI de ~3,3 kb de pCGP2000 (que contiene fragmento del promotor *CaMV 35S* en pBluescript SK)

Inserto: fragmento EcoRI (romero)/XhoI ocs 3' de ~1,6 kb de pKIWI101

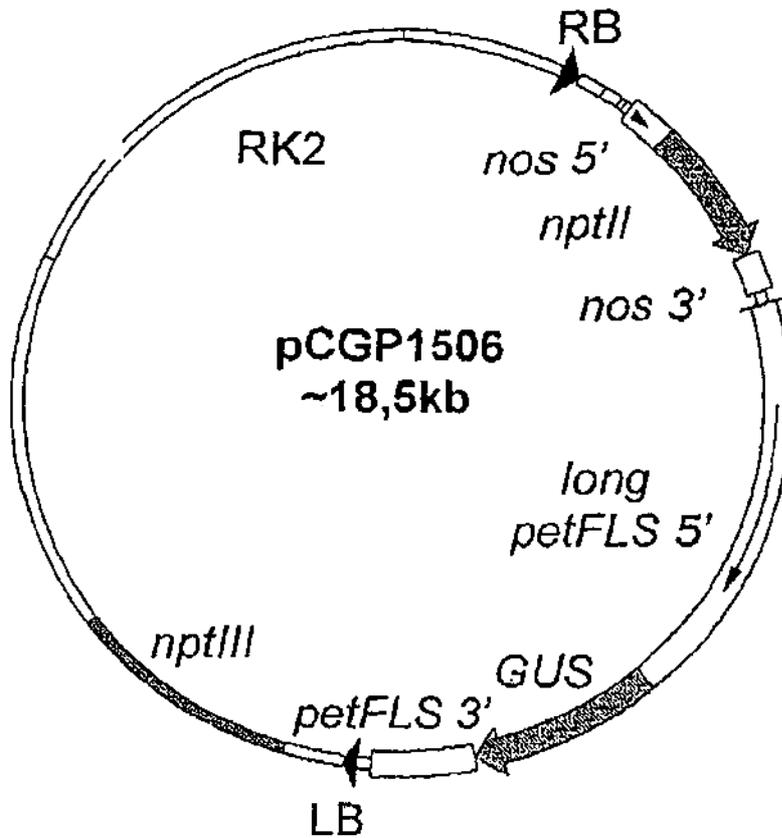
Figura 17



Replicón: vector pCGN1548 de HindIII/PstI de ~15 kb

Inserto: fragmento HindIII/PstI de ~5,3 kb que contiene el gen *petD8 5'*: *GUS*: *petD8 3'* de pCGP1106

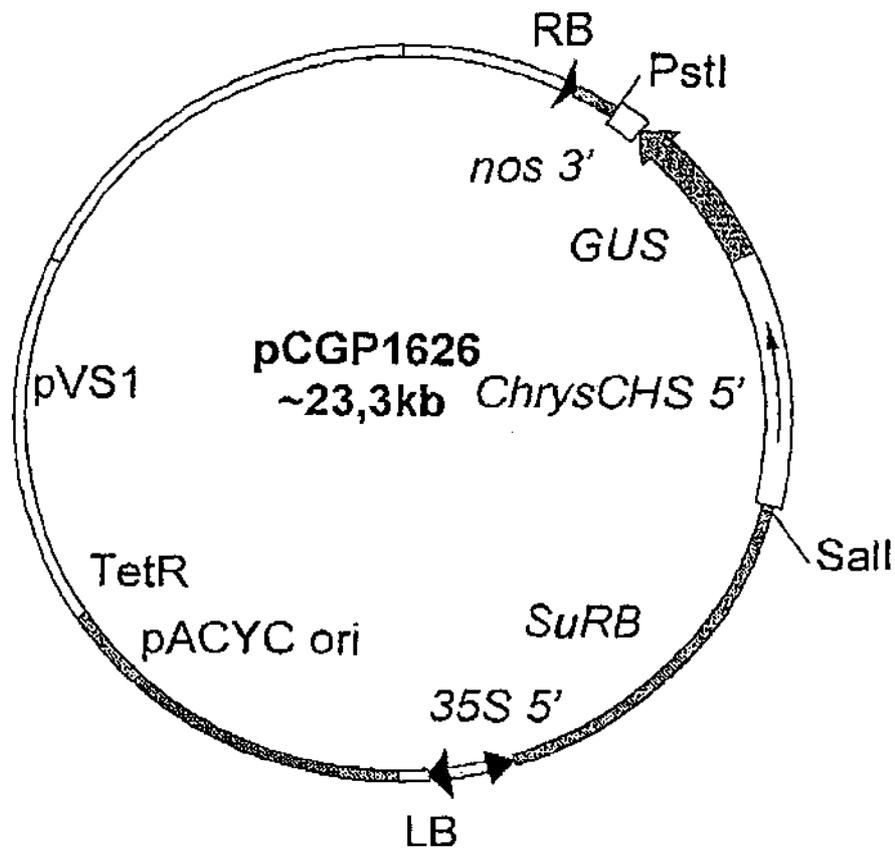
Figura 18



Replicón: vector pBIN19 de BamHI
(lleno de GA)/SacI de ~11,8 kb

Inserto: fragmento XhoI (lleno de TC)/SacI
de ~6,7 kb que contiene el gen
longpetFLS 5': *GUS*: *petFLS 3'* de pCGP496

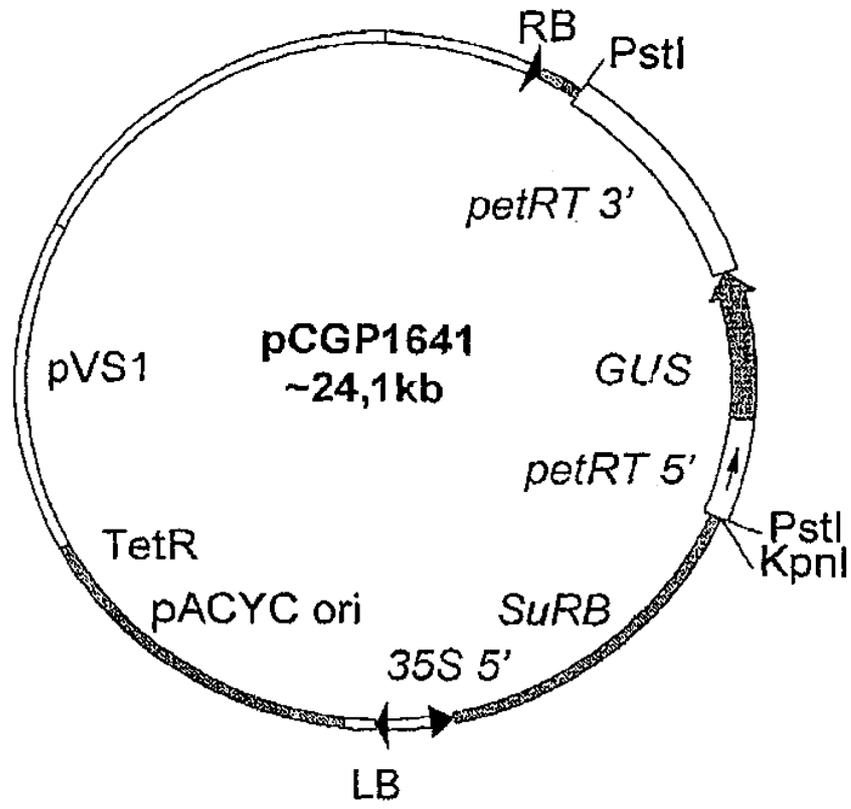
Figura 19



Replicón: vector pWTT2132 de PstI/BamHI de ~18,7 kb

Inserto: fragmento PstI/BglII de ~4,6 kb que contiene el gen *ChrysCHS* 5': *GUS*: nos 3' de pCGP1622

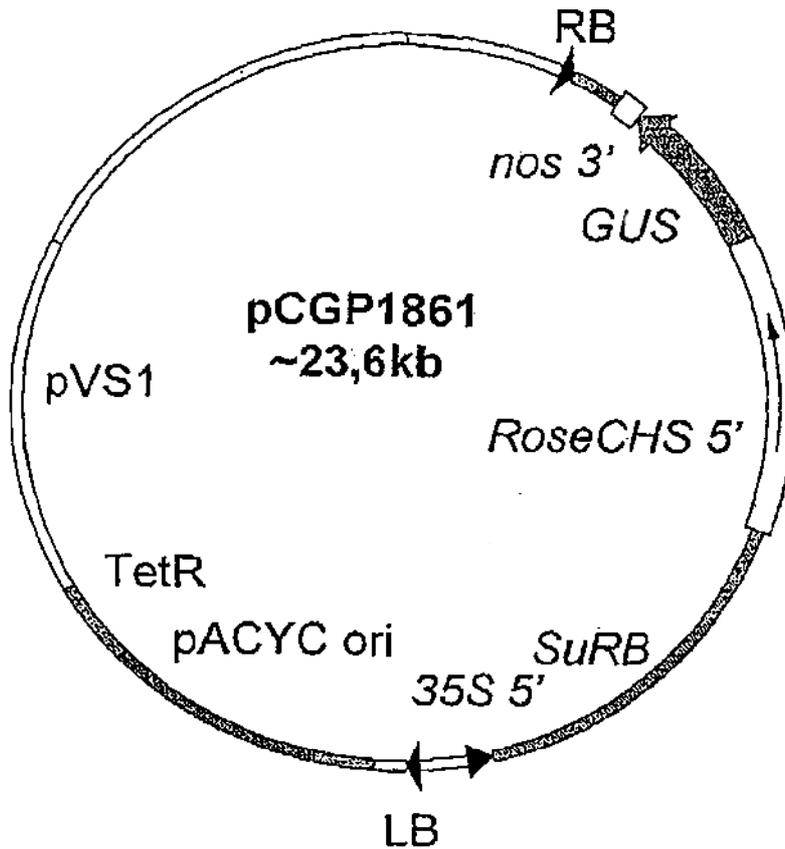
Figura 20



Replicón: vector pWTT2132 de PstI de ~18,7 kb

Inserto: fragmento PstI de ~5,4 kb que contiene el gen *petRT 5'*: *GUS*: *petRT 3'* de pCGP1628

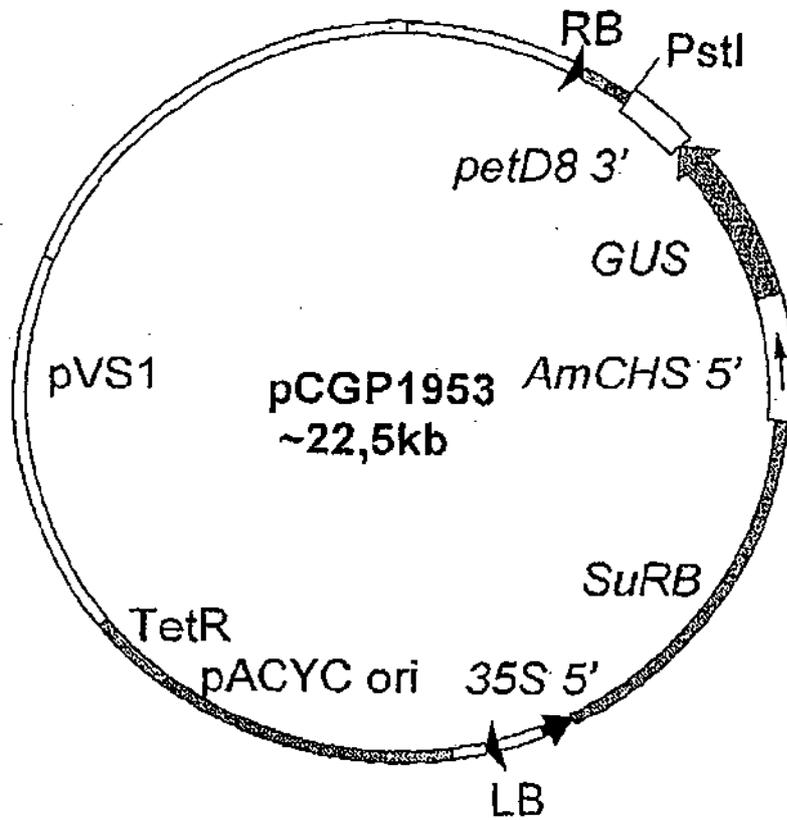
Figura 21



Replicón: vector pWTT2132 de BamHI de ~18,7 kb

Inserto: fragmento BglII de ~5 kb que contiene el gen *RoseCHS 5'*: *GUS*: *nos 3'* de pCGP197

Figura 22



Replicón: vector pWTT2132 de Asp718 (romo) de ~18,7 kb

Inserto: fragmento romo (EagI/PstI) de ~3,8 kb que contiene el gen *AmCHS* 5': *GUS*: *petD8* 3' de pCGP1952

Figura 23

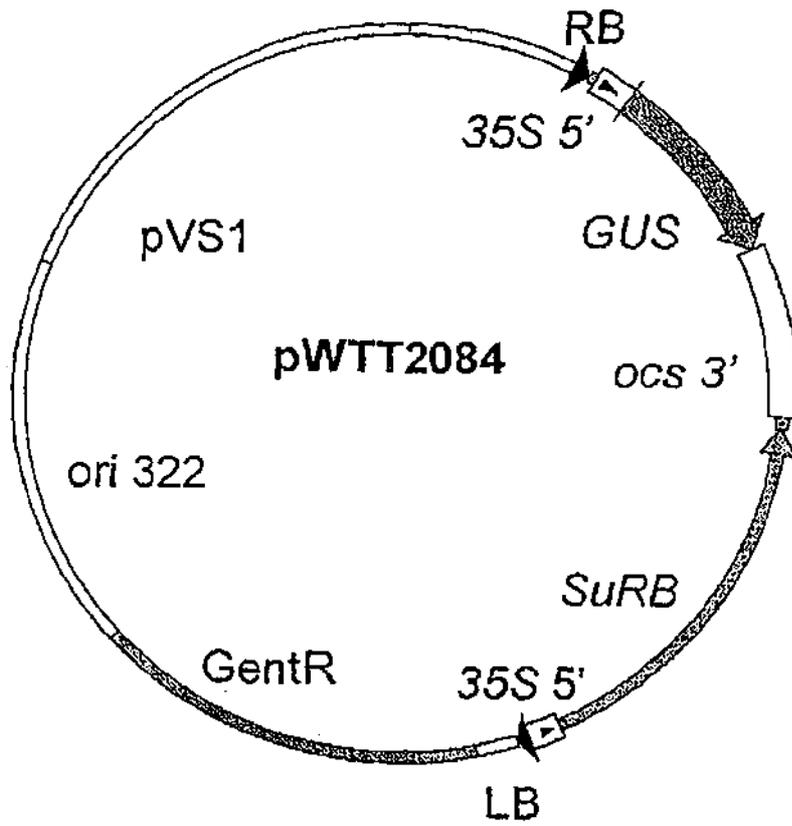
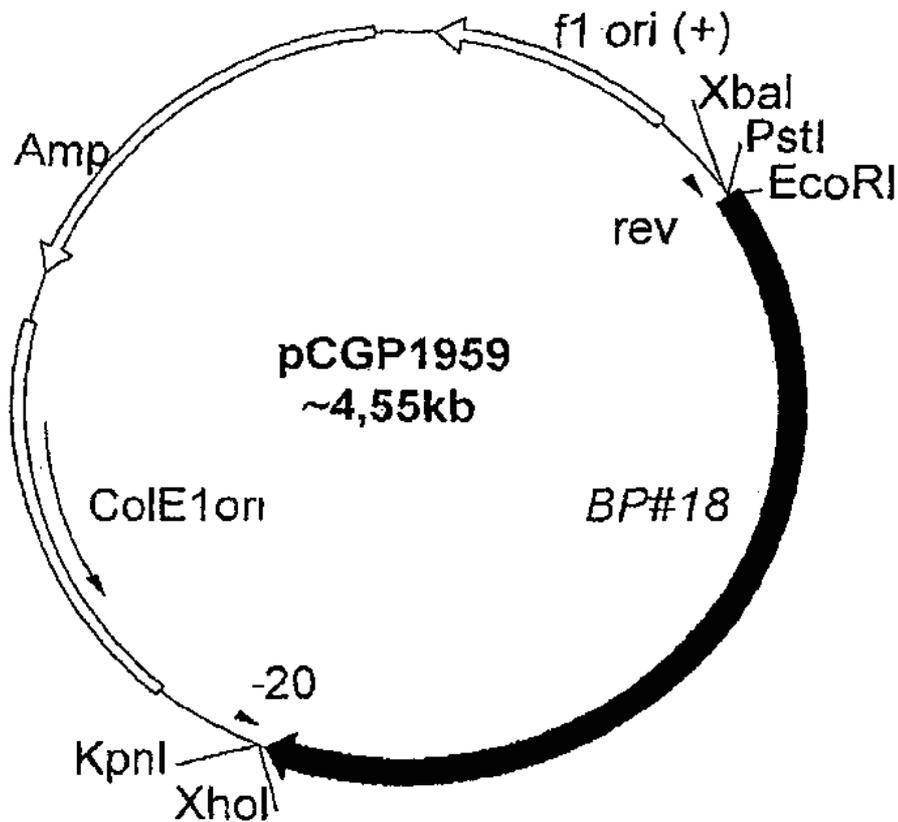


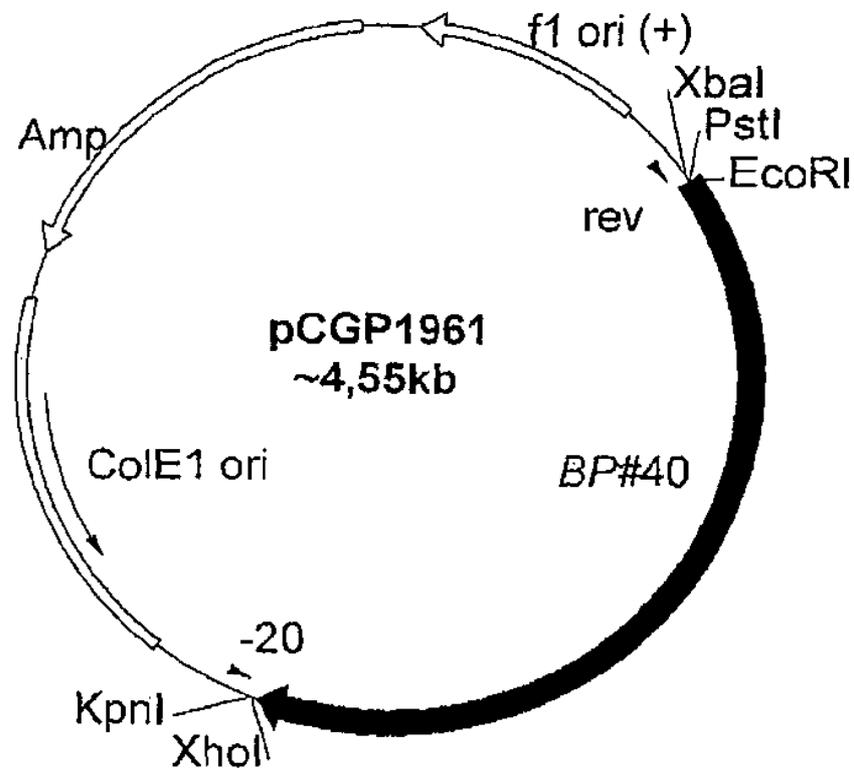
Figura 24



Replicón: vector pBluescript SK II (+) 2,95 kb

Inserto: ADNc de *F3'5'H BP#18* de *pensamiento* de ~1,6 kb de *Viola spp.* cv. *pensamiento negro*

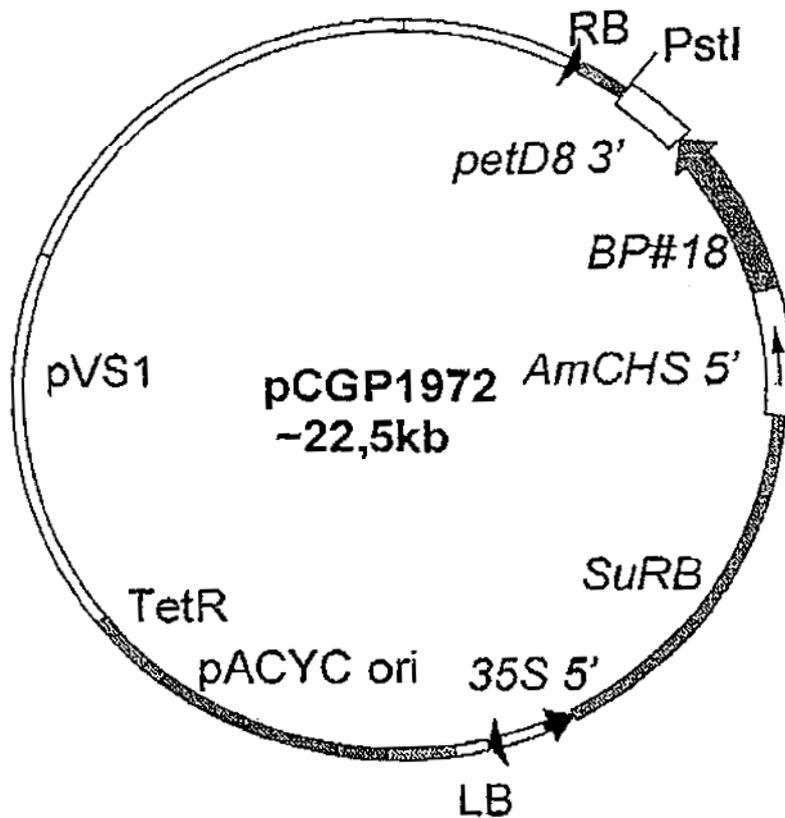
Figura 25



Replicón: vector pBluescript SK II (+)
2,95 kb

Inserto: ADNc de *F3'5'H BP#40* de pensamiento de ~1,6 kb de *Viola* spp. cv. pensamiento negro

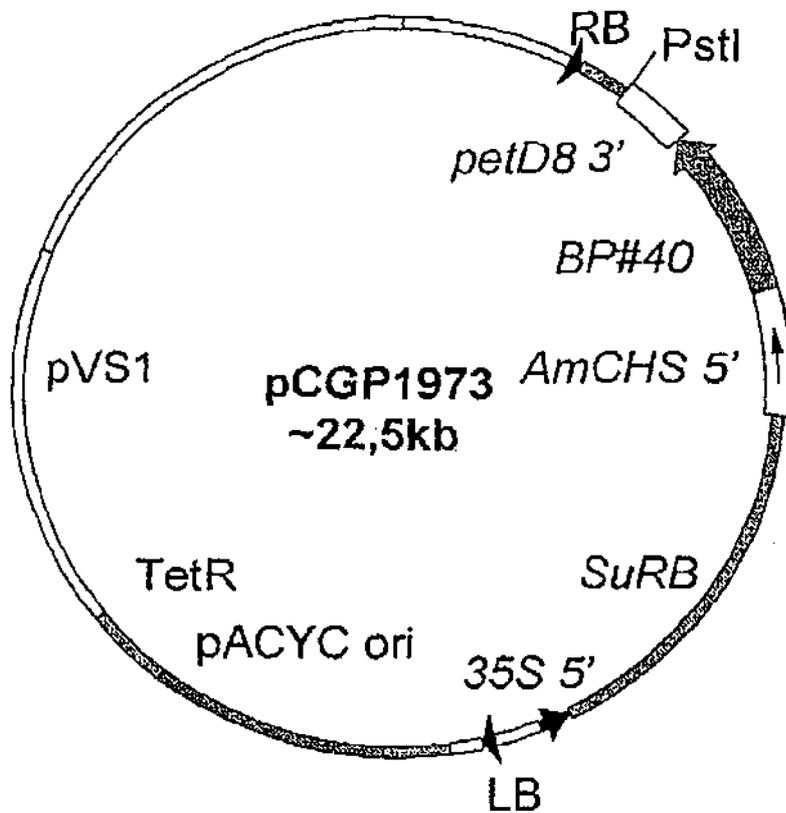
Figura 26



Replicón: vector pWTT2132 de Asp718 (romo) de ~18,7 kb

Inserto: fragmento NotI (romo)/EcoRV de ~3,8 kb que contiene el gen *AmCHS* 5':
BP#18: *petD8* 3' de pCGP1970

Figura 27

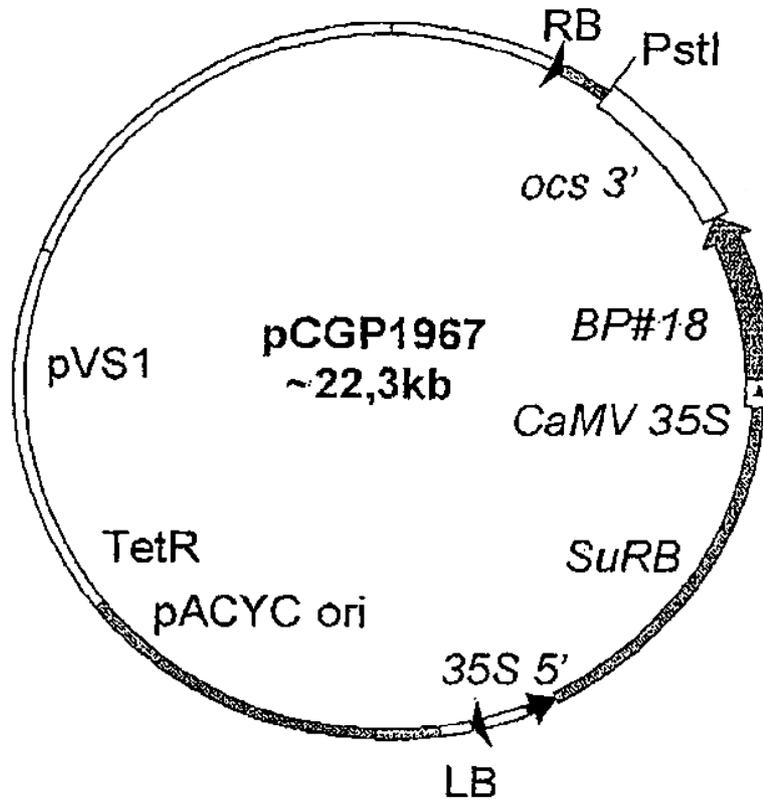


Replicón: vector pWTT2132 de Asp718 (romo) de ~18,7 kb

Inserto: fragmento NotI (romo)/EcoRV de ~3,8 kb que contiene el gen *AmCHS 5'*:

BP#40: *petD8 3'* de pCGP1971

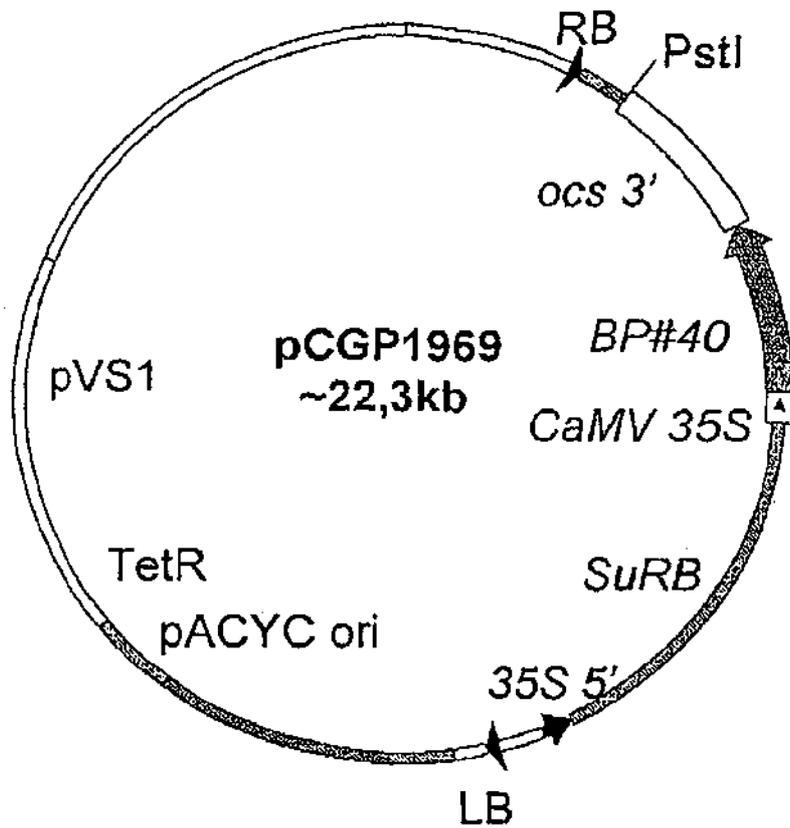
Figura 28



Replicón: vector pWTT2132 de Asp718 (romo) de ~18,7 kb

Inserto: fragmento romo (XhoI/XbaI) de ~3,6 kb que contiene el gen *CaMV 35S*: BP#18: ocs 3' de pCGP1965

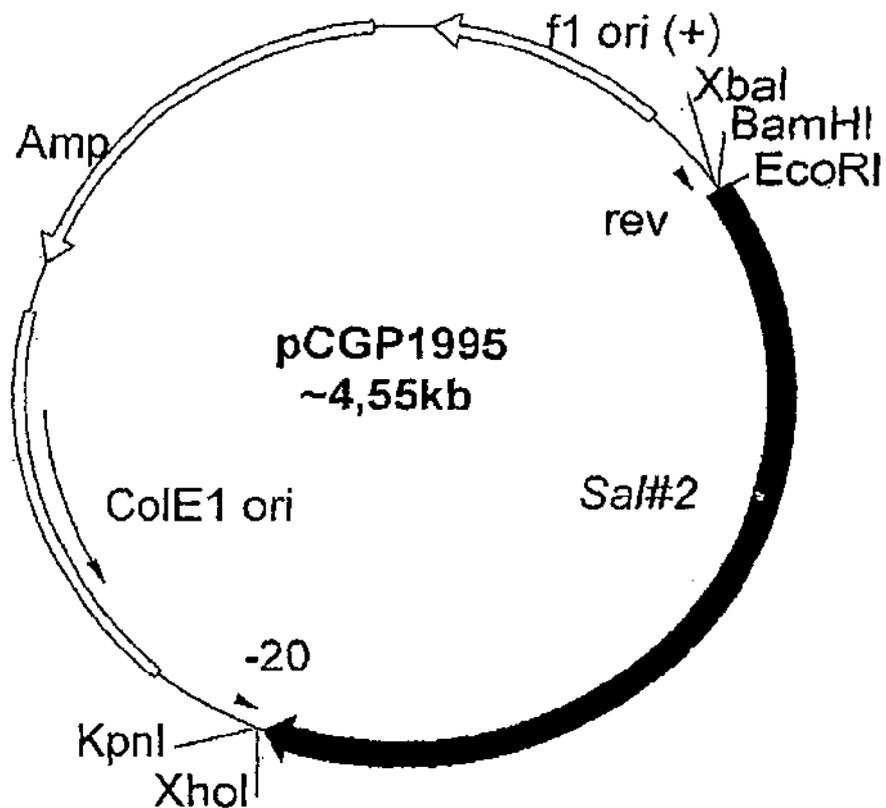
Figura 29



Replicón: vector pWTT2132 de Asp718 (romo) de ~18,7 kb

Inserto: fragmento romo (XhoI/XbaI) de ~3,6 kb que contiene el gen *CaMV 35S*: *BP#40*: *ocs 3'* de pCGP1966

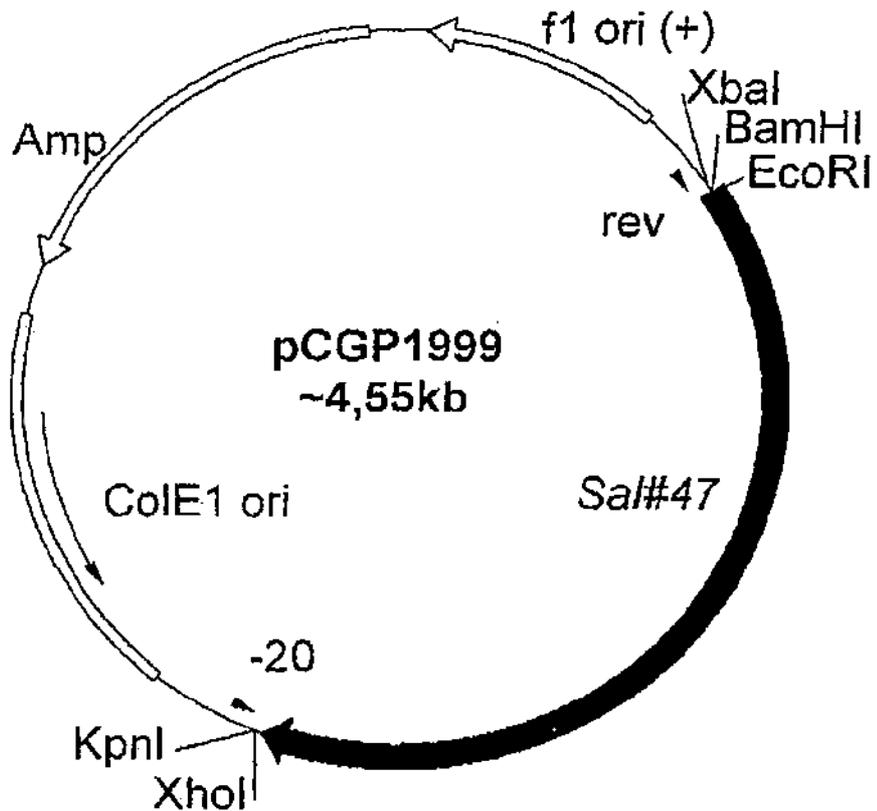
Figura 30



Replicón: vector pBluescript SK II (+) 2,95 kb

Inserto: ADNc de F3'5'H Sal#2 de ~1,6 kb de *Salvia spp.*

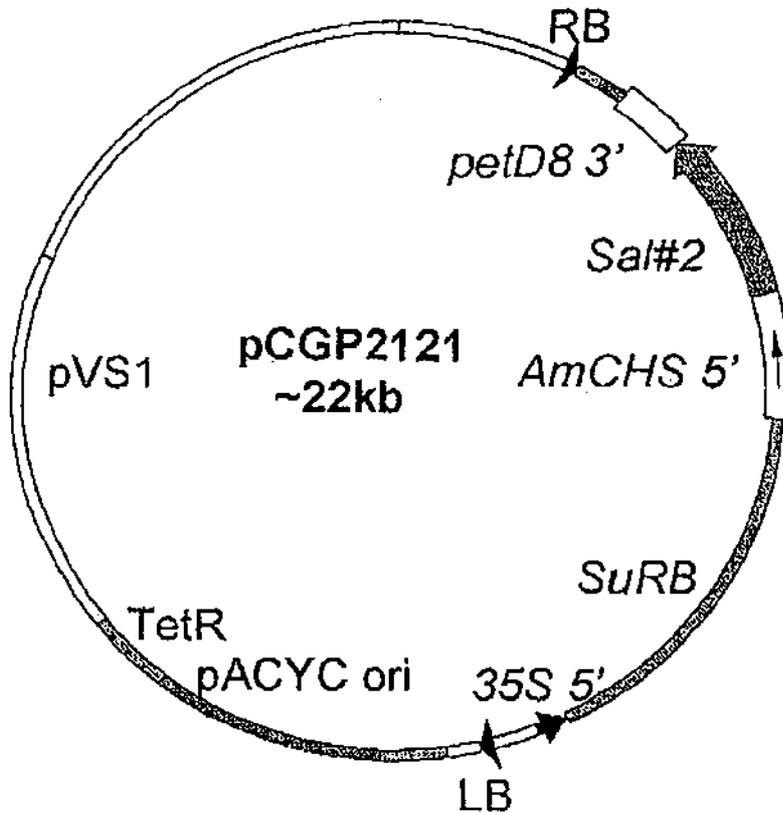
Figura 31



Replicón: vector pBluescript SK II (+)
2,95 kb

Inserto: ADNc de F3'5'H Sal#47 de ~1,6 kb de
Salvia spp.

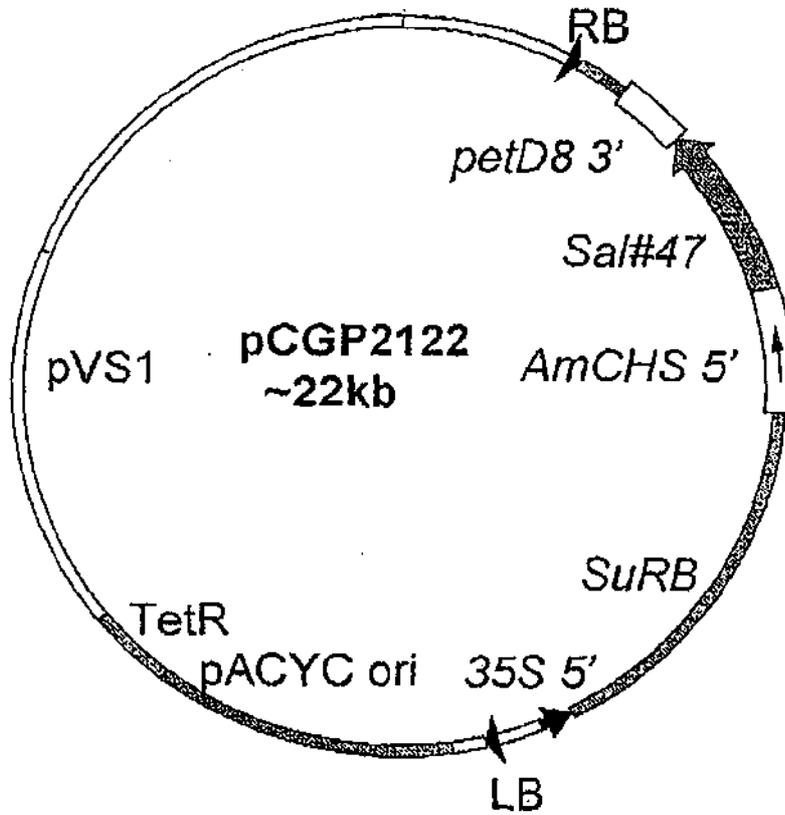
Figura 32



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: fragmento NotI (romo)/EcoRV de ~3,6 kb que contiene el gen *AmCHS 5'*: *Sal#2*: *petD8 3'* de pCGP2116

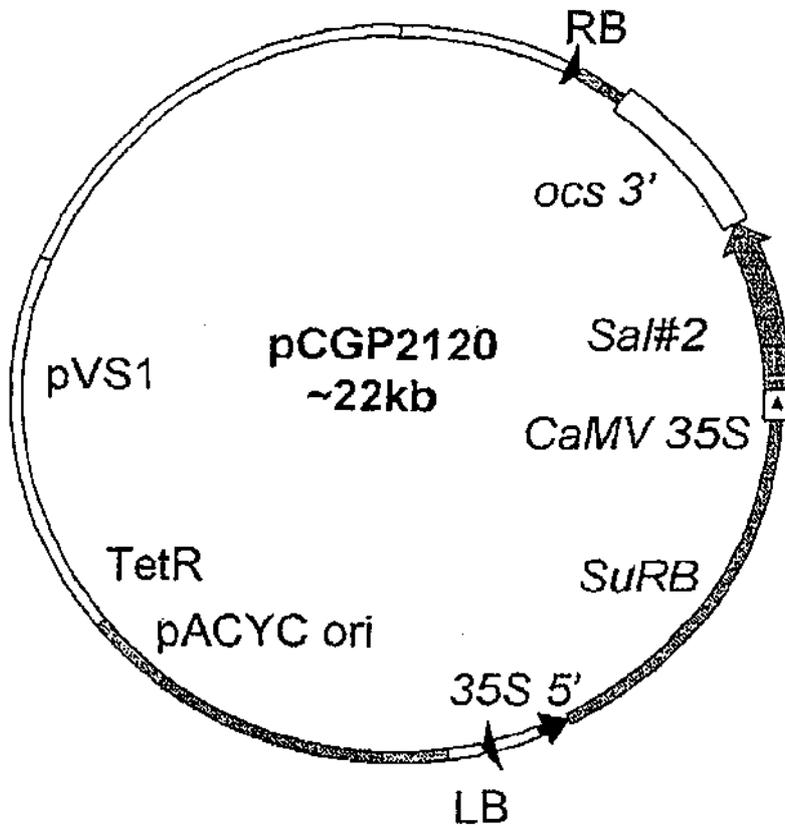
Figura 33



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: fragmento NotI (romo)/EcoRV de ~3,6 kb que contiene el gen *AmCHS 5'*:
Sal#47: petD8 3'
 de pCGP2117

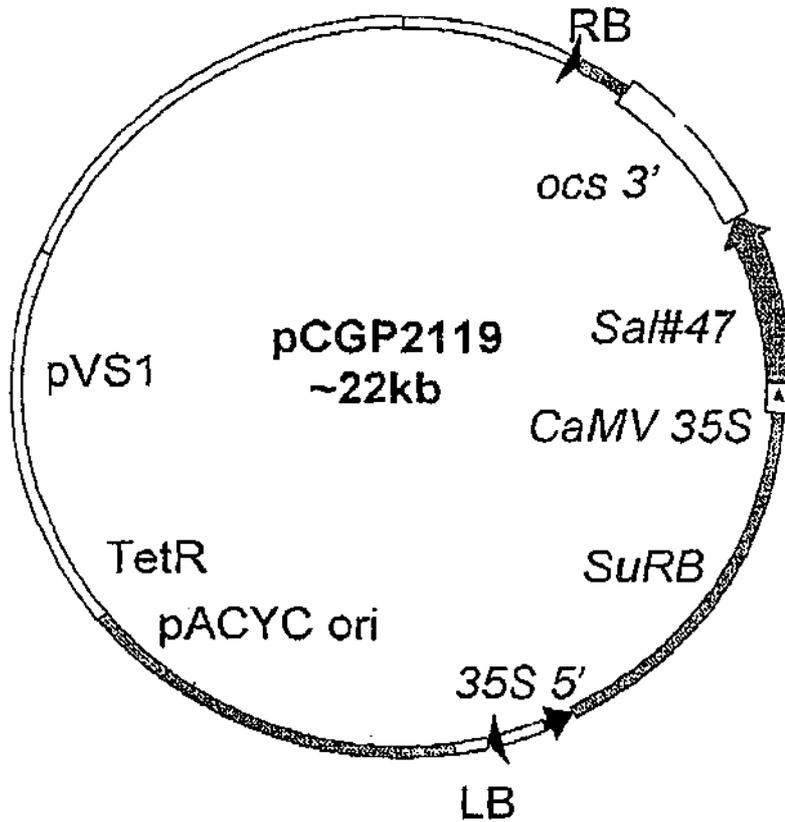
Figura 34



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: fragmento romo (XhoI/XbaI) de ~3,6 kb que contiene el gen *CaMV 35S*:
Sal#2: ocs 3' de pCGP2112

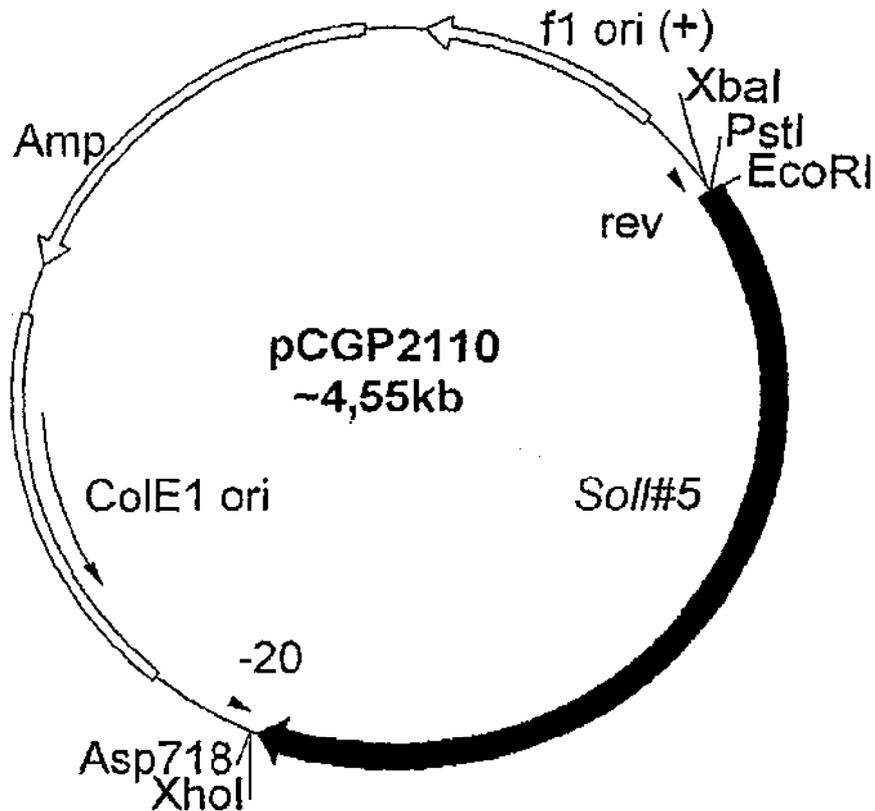
Figura 35



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: fragmento romo (XhoI/XbaI) de ~3,6 kb que contiene el gen *CaMV 35S*: *Sal#47*: *ocs 3'* de pCGP2111

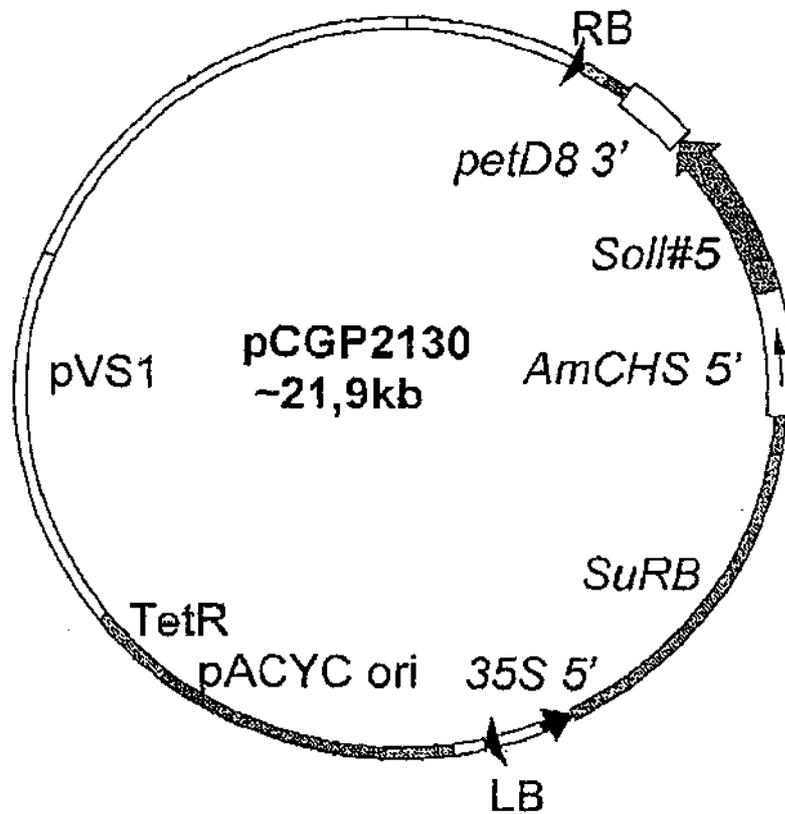
Figura 36



Replicón: vector pBluescript SK II (+)
2,95 kb

Inserto: ADNc de *F3'5'H SolI#5* de ~1,7 kb
de *Sollya spp.*

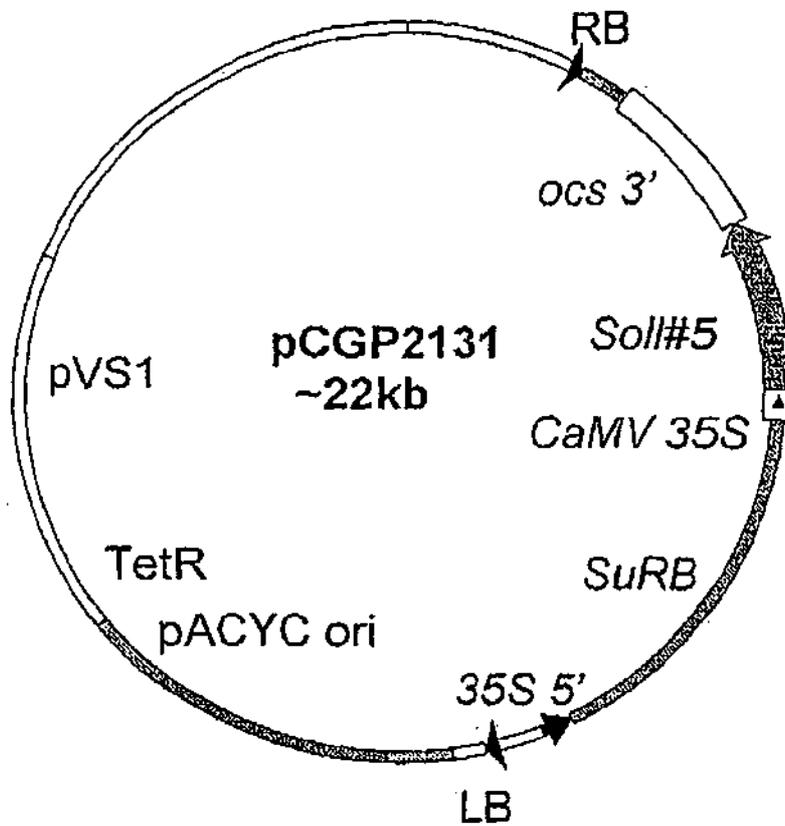
Figura 37



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: fragmento NotI (romo)/EcoRV de ~3,5 kb que contiene el gen *AmCHS 5'*:
Soll#5: *petD8 3'* de pCGP2128

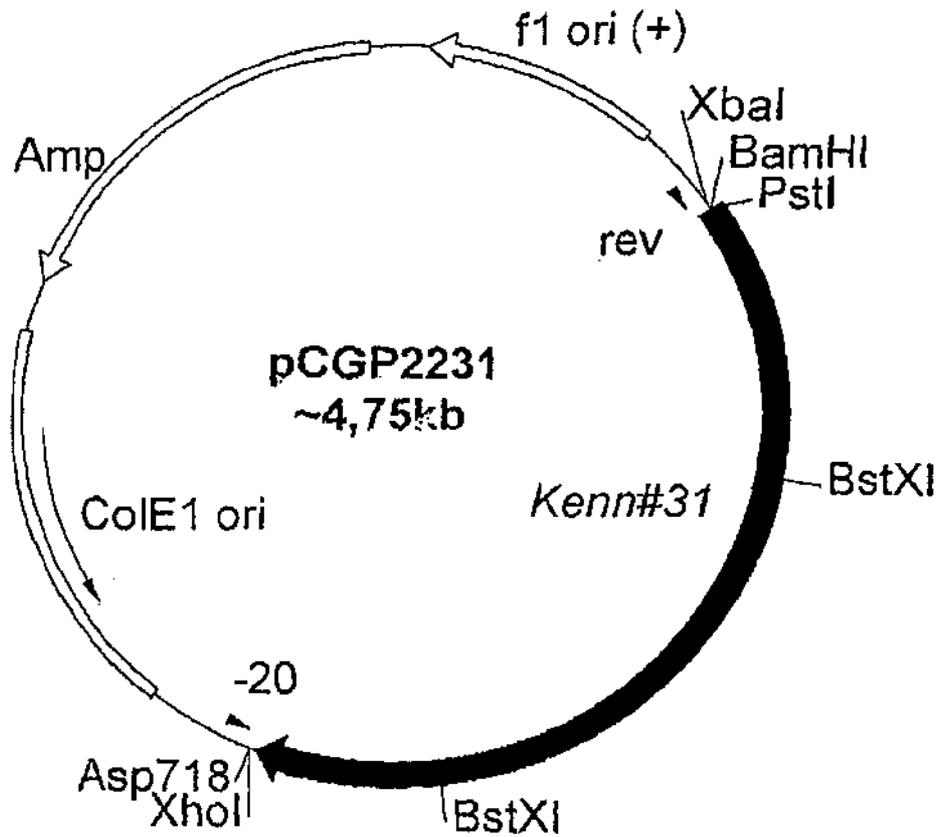
Figura 38



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: fragmento romo (Asp718/XbaI) de ~3,6 kb que contiene el gen *CaMV 35S*:
Soll#5: *ocs 3'* de pCGP2129

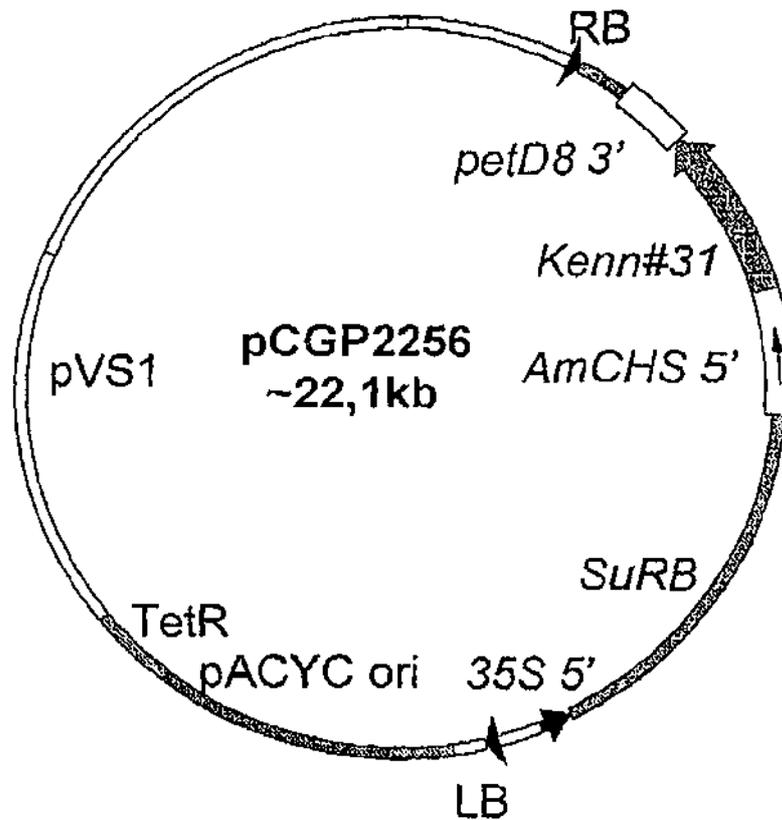
Figura 39



Replicón: vector pBluescript SK II (+) 2,95 kb

Inserto: ADNc de *F3'5'H Kenn#31* de ~1,8 kb de *Kennedia spp.*

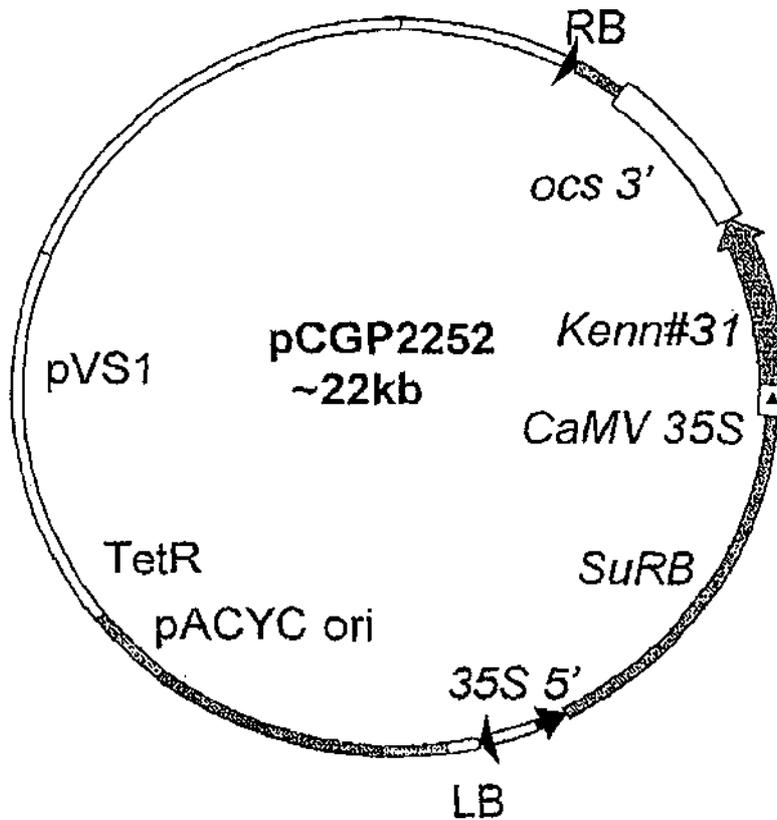
Figura 40



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: Fragmento romo (NotI/EcoRI) de ~3,7 kb que contiene el gen *AmCHS 5'*:
Kenn#31: petD8 3' de pCGP2242

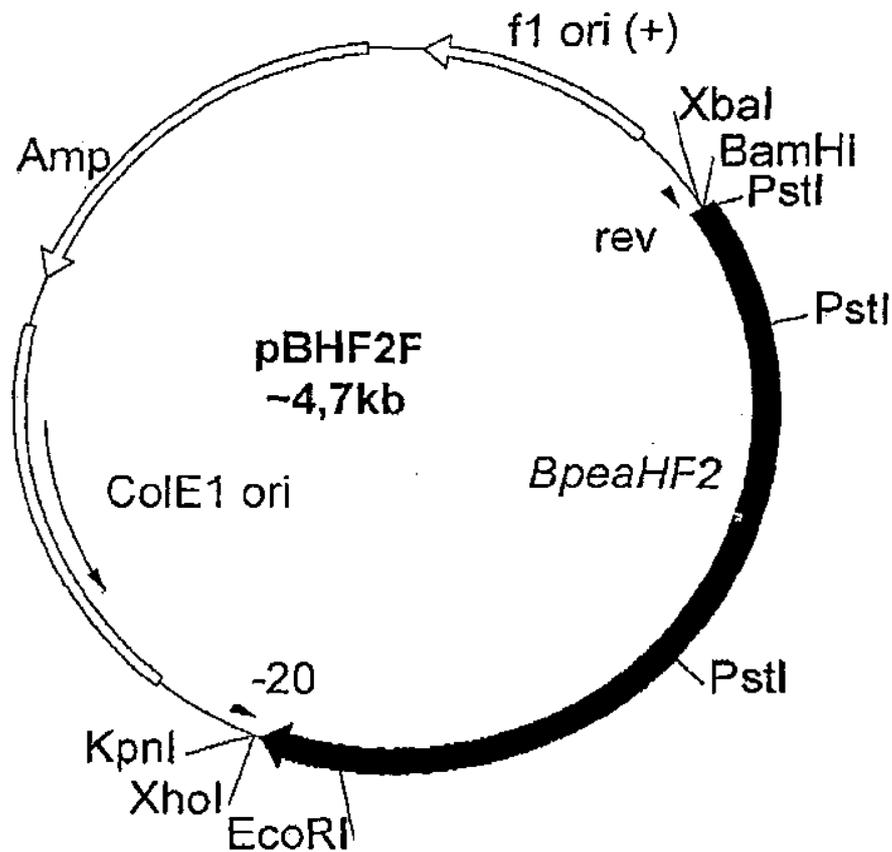
Figura 41



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: fragmento romo (XhoI/NotI) de ~3,6 kb que contiene el gen *CaMV 35S: Kenn#31: ocs 3'* de pCGP2236

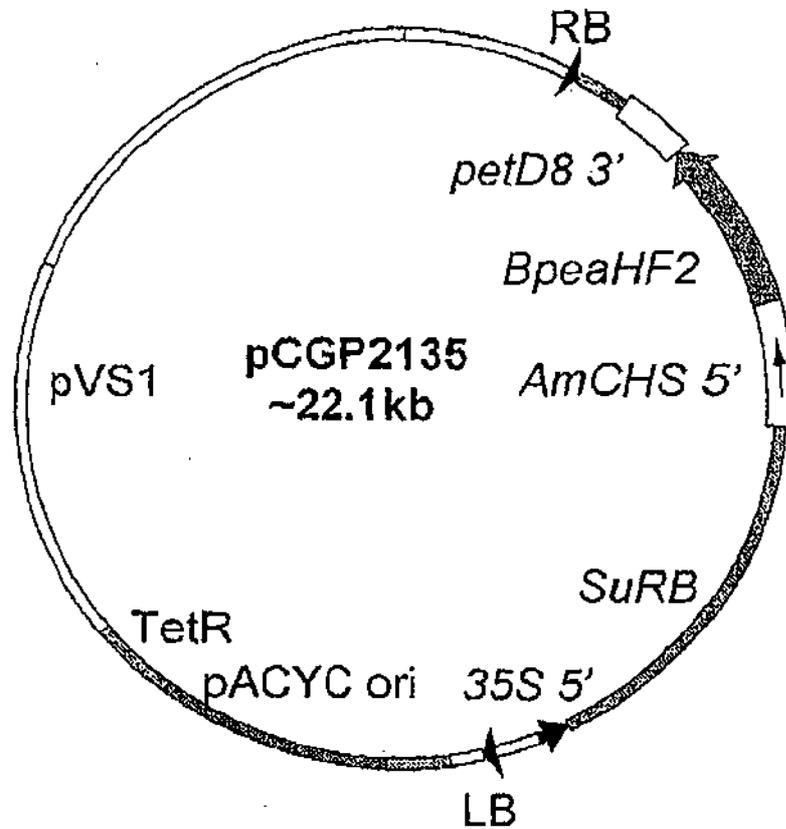
Figura 42



Replicón: vector pBHF2 de BamHI/PstI de 4,5 kb + inserto *BpeaHF2* parcial (esqueleto = vector pBluescript SK II (+))

Inserto: fragmento BamHI/PstI de ~200 pb de PCR usando pBHF2 como molde (fragmento 5' de ADNc de *F3'5'H* de campanilla (*BpeaHF2*) de *Clitoria ternatea* incluyendo el codón de iniciación putativo (ATG))

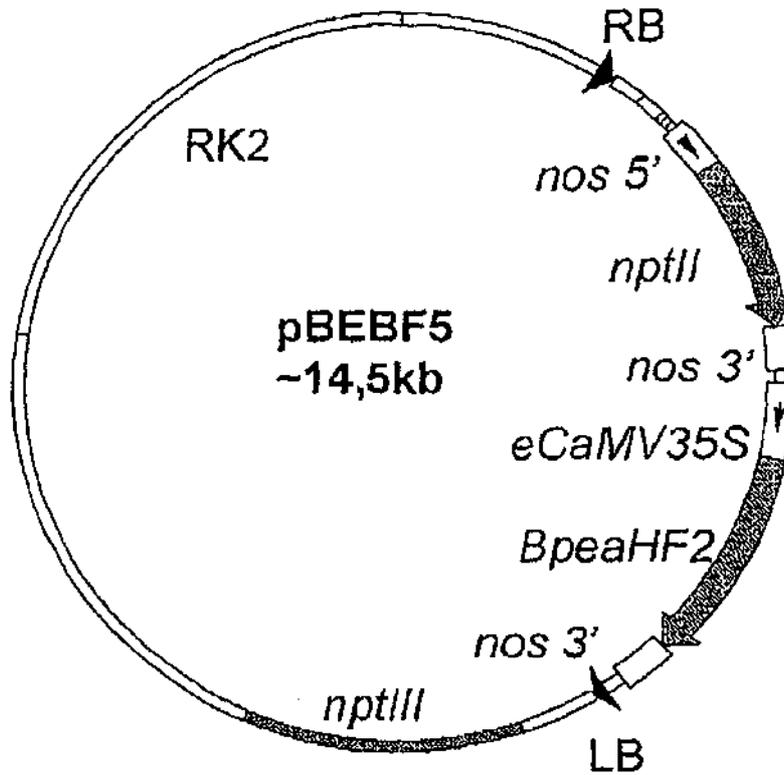
Figura 43



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: fragmento NotI (romo)/EcoRV de ~3,6 kb que contiene el gen *AmCHS 5'*: *BpeaHF2*: *petD8 3'* de pCGP2133

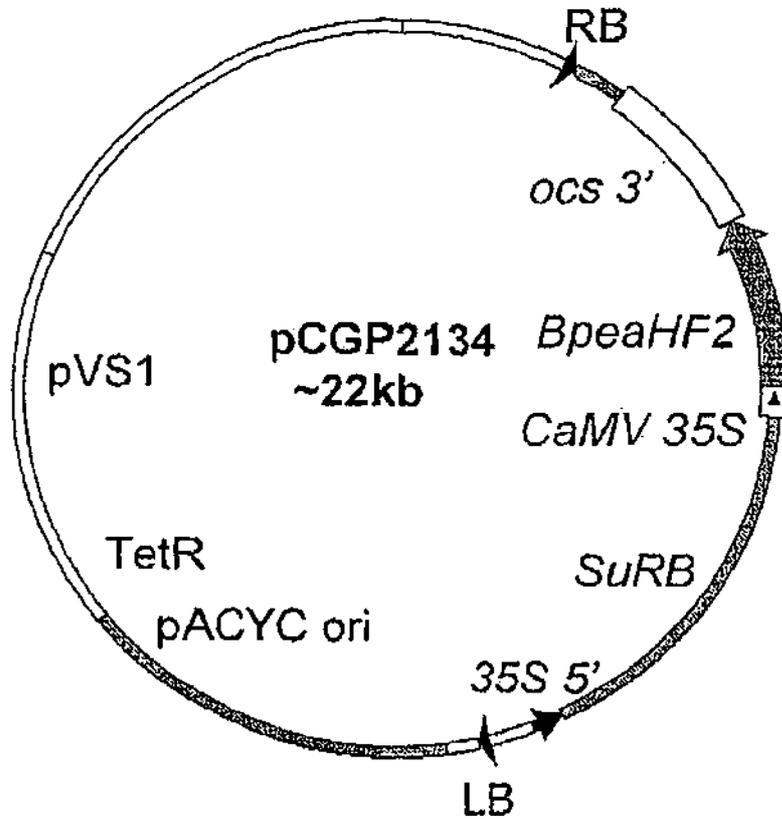
Figura 44



Replicón: BamHI/Sall de PBE2113-GUSs de ~12,8 kb (esqueleto pBI121)

Inserto: fragmento BamHI/XhoI de ~1,7 kb que contiene clon de ADNc de *F3'5'H BpeaHF2* de *Clitoria* pBHF2F

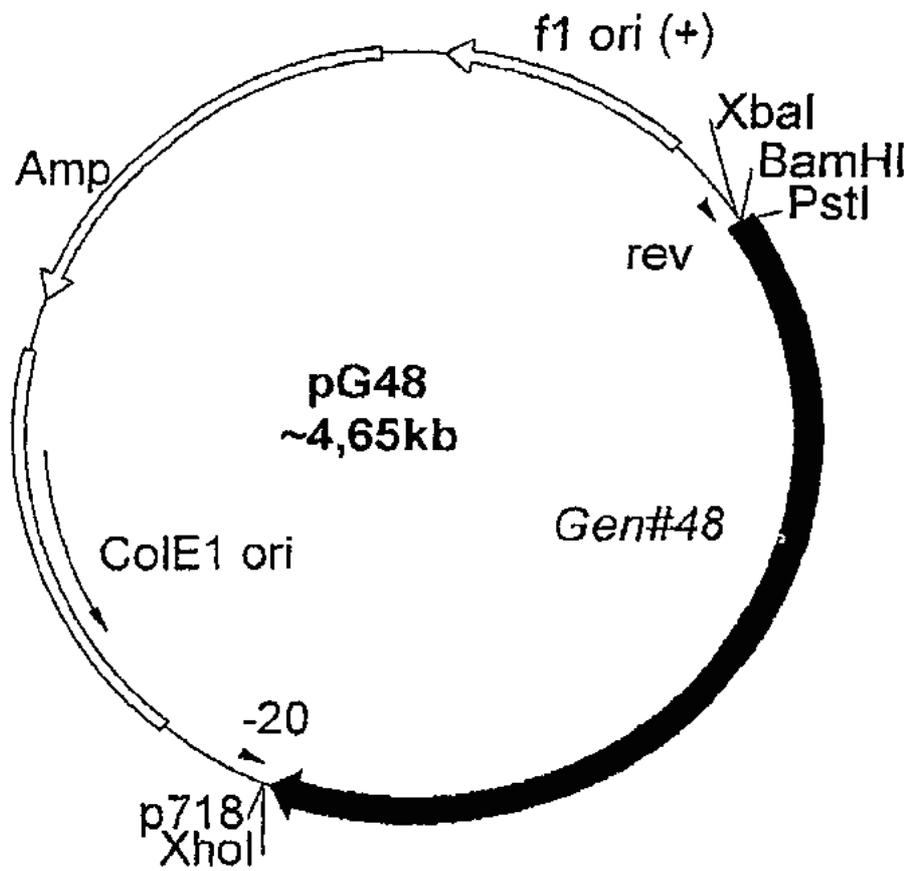
Figura 45



Replicón: vector pCGP1988 de Asp718 (romo) de ~18,4 kb

Inserto: fragmento romo (XhoI/XbaI) de ~3,6 kb que contiene el gen *CaMV 35S: BpeaHF2: ocs 3'* de pCGP2132

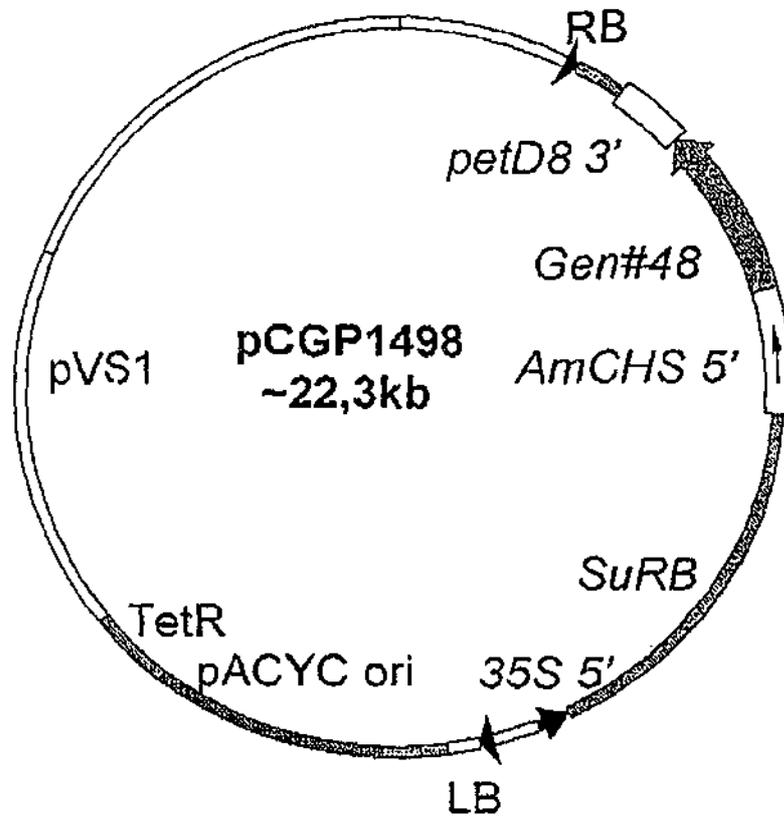
Figura 46



Replicón: vector pBluescript SK II (+) 2,95 kb

Inserto: ADNc de *F3'5'H Gen#48* de ~1,7 kb de *Gentiana triflora*

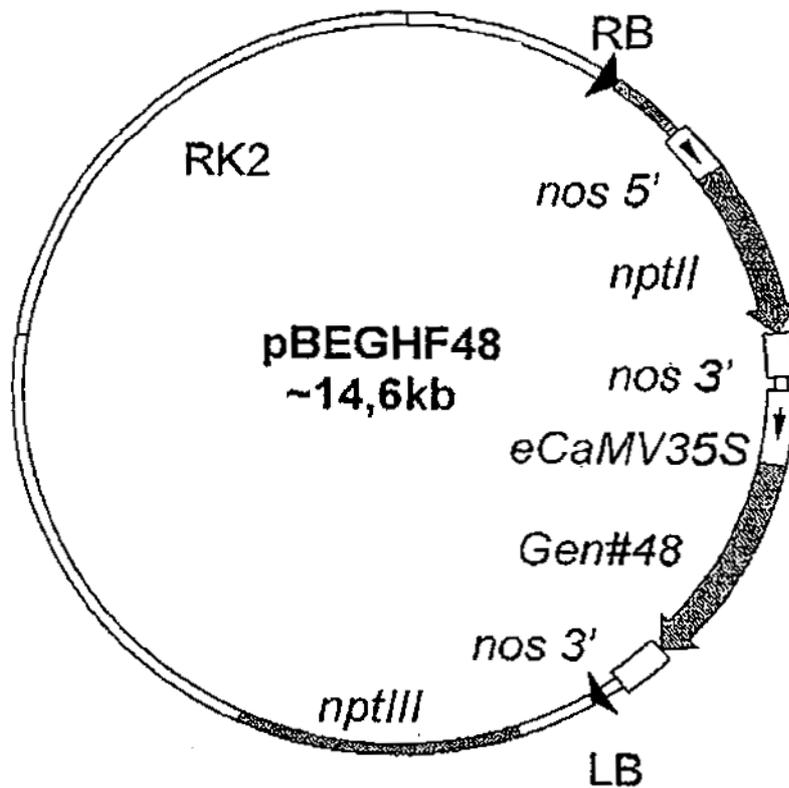
Figura 47



Replicón: vector pWTT2132 de Asp718 (romo) de ~18,7 kb

Inserto: fragmento NotI (romo)/EcoRV de ~3,6 kb que contiene el gen *AmCHS* 5':
Gen#48: *petD8* 3' de pCGP1496

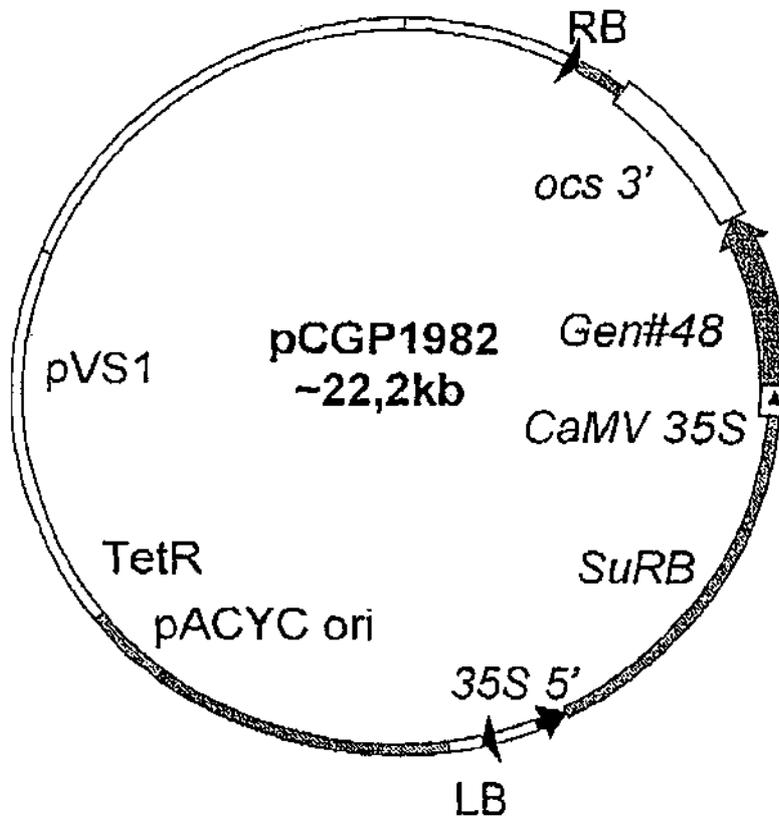
Figura 48



Replicón: BamHI/Sall de PBE2113-GUSs de ~12,8 kb (esqueleto pBI121)

Inserto: fragmento BamHI/XhoI de ~1,8 kb que contiene clon de ADNc de *F3'5'H* (*Genn#48*) de *genciana* de pG48

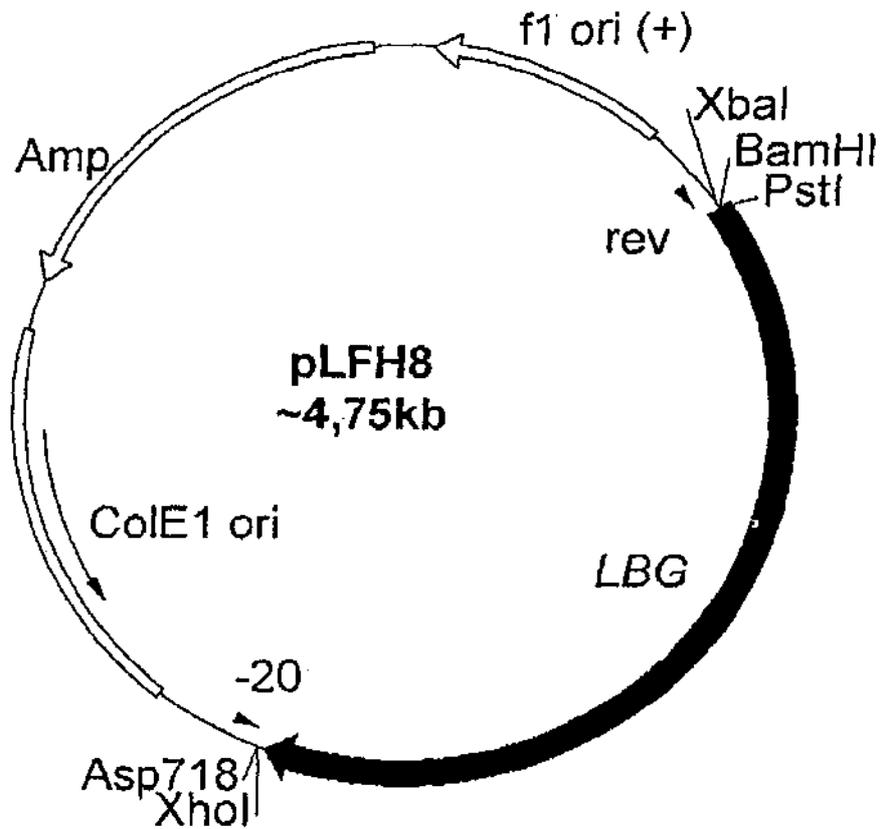
Figura 49



Replicón: vector pWTT2132 de Asp718 (romo) de ~18,7 kb

Inserto: fragmento romo (XhoI/XbaI) de ~3,6 kb que contiene el gen *CaMV 35S*:
Gen#48: *ocs 3'* de pCGP1981

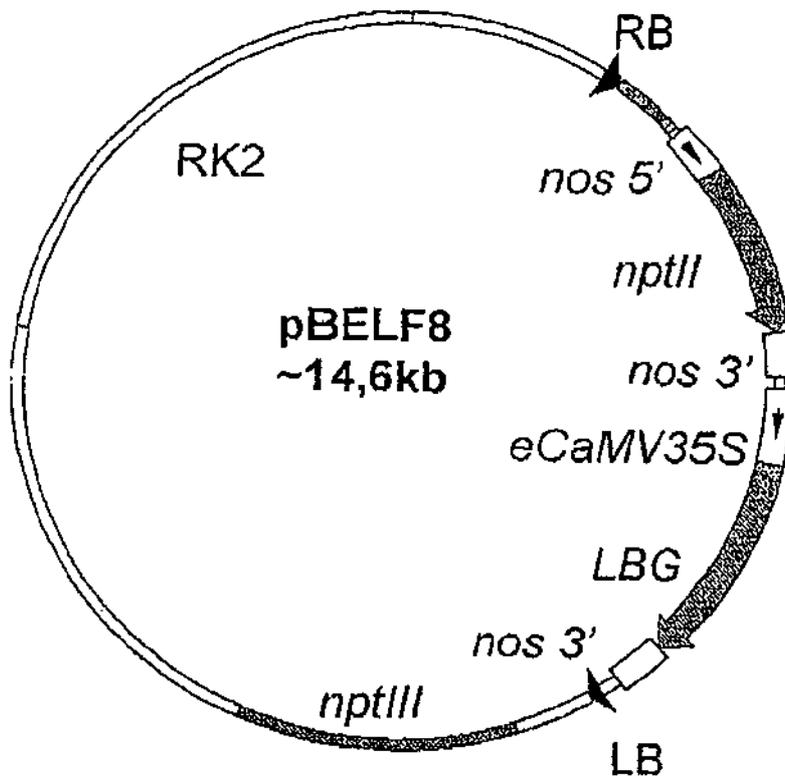
Figura 50



Replicón: vector pBluescript SK II (+) de 2,95 kb

Inserto: ADNc de *F3'5'H LBG* de *lavanda* de ~1,8 kb de *Lavendula nil*

Figura 51



Replicón: BamHI/Sall de PBE2113-GUSs de ~12,8 kb (esqueleto pBI121)

Inserto: fragmento BamHI/XhoI de ~1,8 kb que contiene clon de ADNc de *F3'5'H* (LBG) de *lavanda* de pLHF8

Figura 52